



TITLE:

新規6-亜鉛フィンガー蛋白質によるDNA湾曲の誘発(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

今西, 未来

CITATION:

今西, 未来. 新規6-亜鉛フィンガー蛋白質によるDNA湾曲の誘発. 京都大学, 2002, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2002-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k9513>

RIGHT:

新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 湾曲の誘発

2002

今西 未来

新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質による
DNA 湾曲の誘発

2002

今西 未来

目 次

序 章	新規亜鉛フィンガー蛋白質の創製	3
第一章	ポリグリシンリンカーを有する新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質による	
	DNA 湾曲の誘発	10
第一節	新規 DNA 湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製	10
第二節	リンカーの長さの違いによる結合様式の違い	13
第三節	DNA 構造変化の検出	15
第四節	Phasing Analysis による DNA 構造変化の解析	18
第二章	電荷の異なるリンカーを有する DNA 湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製	
	DNA 結合の速度論解析	28
第一節	電荷を有する 6-亜鉛フィンガー蛋白質の創製	28
第二節	6-亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 結合様式	30
第三節	Phasing Analysis による DNA 構造変化の検出	32
第四節	表面プラズモン共鳴を利用した結合速度解析	35
総 括		41
実験の部		44
	第一章に関する実験	44
	第二章に関する実験	48
引用文献		52
謝辞		55

序章

新規亜鉛フィンガー蛋白質の創製

遺伝子の転写において、特定の配列に選択的に結合する蛋白質は重要な役割を担っている。それ故、特定の遺伝子の発現を制御することができれば、さまざまな疾患の治療につながる。しかしながら、ヒトゲノムは約 3×10^9 塩基対にも及び、細胞中には膨大な数の遺伝子が存在する。その中から特定の遺伝子の転写を制御するためには、任意の塩基配列に結合できる蛋白質が求められる。多くの転写因子の DNA 結合領域に存在する「亜鉛フィンガーモチーフ」は、その特徴的な DNA 結合様式から、数々の新規 DNA 結合蛋白質の創製に応用されている。

C2H2 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識

C2H2 型亜鉛フィンガーは代表的な DNA 結合モチーフの一つである。一つのモチーフは約 30 アミノ酸残基のコンセンサス配列「(F/Y)-X-C-X₂₋₄-C-X₃-(F/Y)-X₅-L-X₂-H-X₃₋₅-H-X₂₋₆」から成り、二つのヒスチジンイミダゾール基と二つのシステインチオール基を介して Zn(II) が結合している (1)。この亜鉛の結合により、アミノ末端側の逆平行βシート、カルボキシル末端側のαヘリックス（認識ヘリックス）がコンパクトに折り畳まれ、疎水性相互作用によって安定化された球状モチーフを形成する (Figure 0-1) (2, 3)。Pabo らによる Zif268 の X 線結晶構造解析より、C2H2 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識の特徴として、次のような性質があげられる (4, 5) (Figure 0-2)。

1. 一つのフィンガーが連続する 3-4 塩基を認識すること。
2. 複数のフィンガーが直列につながった構造をとって DNA を認識すること。
3. 単量体で結合し、非回文塩基配列を認識すること。

このような独特の認識様式を示す構造単位 C2H2 型亜鉛フィンガーモチーフは、任意塩基配列認識蛋白質の創製にとって、極めて魅力的なモチーフであると考えられる。

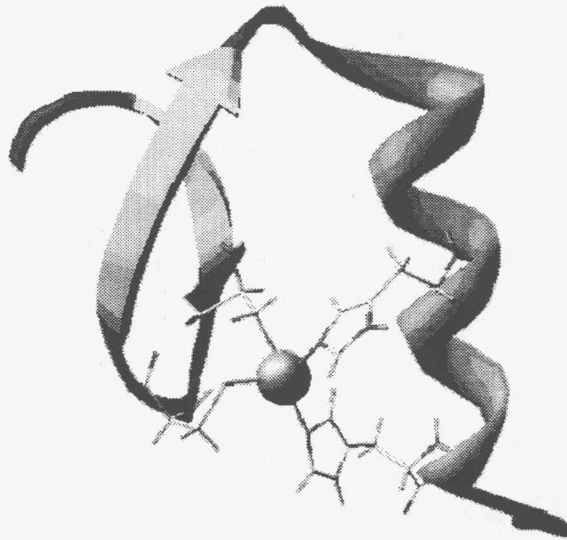


Figure 0-1 Structure of the C2H2 type zinc finger motif, Sp1-finger3 (V. A. Narayan et al.). One finger is approximately 30 amino acid residues long and consists of a simple $\beta\beta\alpha$ fold. This fold is stabilized by hydrophobic interactions and also by chelation of a simple zinc ion with the conserved Cys2-His2 residues.

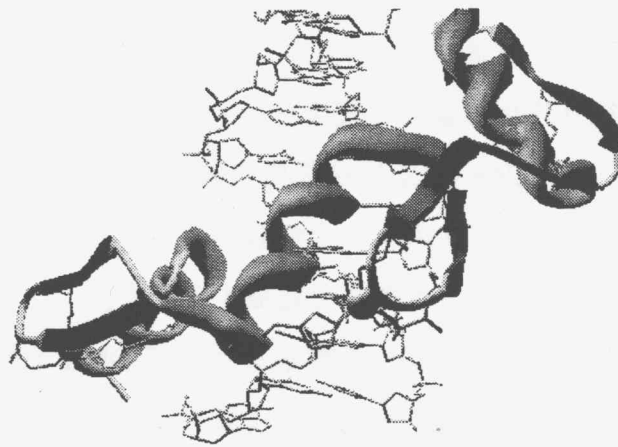


Figure 0-2 The X-ray crystal structure of Zif268-DNA complex (N. P. Pavletich, and C. O. Pabo). The characteristic DNA binding mode of Cys2-His2 zinc finger proteins is revealed as follows: (1) one finger typically recognizes contiguous 3 base pairs (bp) of DNA sequence, (2) DNA recognition is mediated through base contacts with the side-chains of specific amino acids located on the recognition helix, (3) multiple zinc finger domains are tandemly repeated by simple covalent linkage, namely connected by the consensus linker region, and (4) zinc finger proteins bind to the sequence of nonpalindromic base pairs.

新規 C2H2 型亜鉛フィンガー蛋白質のデザイン

一般に天然に存在する多くの DNA 結合蛋白質は、制限酵素に見られるように 10 塩基対以下の DNA 領域しか認識できない。新規 DNA 結合蛋白質は、より長い配列を認識できること、及び任意の標的配列に選択的かつ高い親和性で結合できることが求められる。現在までに、三個の連続する C2H2 型亜鉛フィンガーを有する転写因子 Zif268、及び Sp1 をベースに、様々な新規 DNA 結合蛋白質の設計が展開されてきた。

(1) マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の創製による認識塩基配列の拡張

フィンガーの数を変化させることによって認識塩基配列の長さを変えることが可能であると考えられる。そこで、転写因子 Sp1 に存在する三個の C2H2 型亜鉛フィンガードメインを一単位とし、これら二つ、及び三つを天然に保存されているリンカー配列 (TGEKP) を介して結合させることによって、六個ならびに九個の連続する亜鉛フィンガーをもつマルチフィンガー蛋白質 Sp1ZF6、及び Sp1ZF9 を創製した

(6) (Figure 0-3)。DNaseI フットプリント法の結果から、これらは予想された 18、及び 27 塩基対に結合することが示唆された。このリンカーを用いたマルチフィンガー蛋白質は親和性の顕著な上昇はを示さなかったが、Pabo らはより長いリンカーを導入した六個の亜鉛フィンガーを有する蛋白質を創製し、拡張配列への結合親和性の上昇に成功した (7)。また、Barbas らはルシフェラーゼアッセイを行い、Zif268 をもとに創製した六個のフィンガーを持つ蛋白質が、HeLa 細胞中で転写を制御できることを示している (8,9)。

(2) 亜鉛フィンガーの二量化

Pabo らは Zif268 のフィンガー 1、2 と GAL4 の二量体形成ドメインとを結合することによって、二量化 C2H2 型亜鉛フィンガー蛋白質を創製した (10)。この方法では、認識塩基配列の拡張とともに、二量化による協同効果が期待できる。また、ヘテロダイマー形成による非対称 DNA 配列の認識も可能である。

(3) ファージディスプレイシステムの導入による新たな塩基認識モジュールの創製

Zif268-DNA 複合体の X 線結晶解析から、Zif268 の各フィンガーの認識ヘリックスに存在するアミノ酸残基と塩基との対応関係が明らかになった (4,5)。これによっ

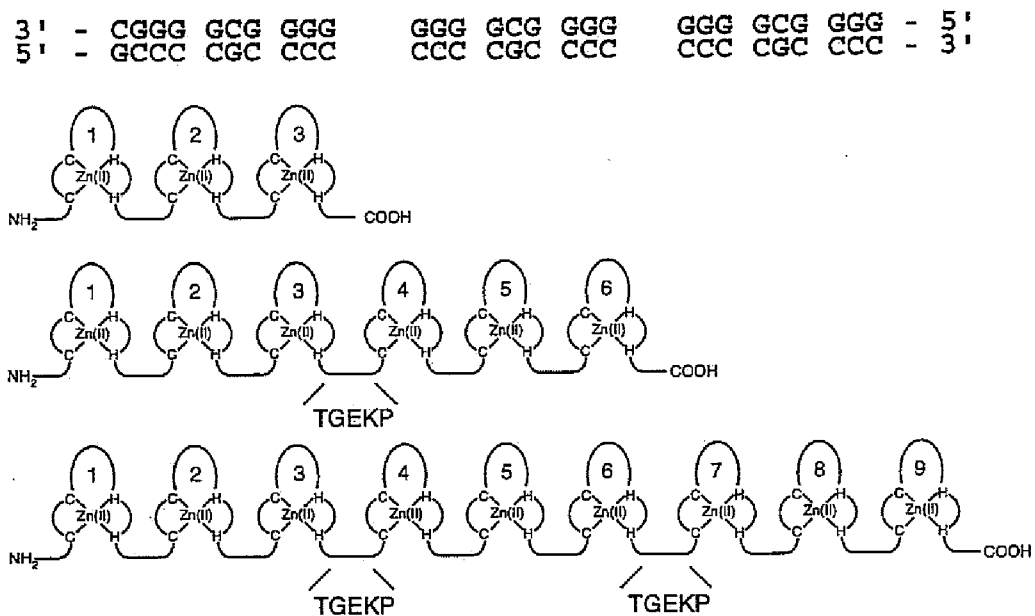


Figure 0-3 Schematic models of WTSp1(530-623), Sp1ZF6, and Sp1ZF9. Sp1ZF6 and Sp1ZF9 were created by connecting two and three 3-zinc finger motifs of Sp1 with 'TGEKP' linker. The DNA sequence is the estimated protein binding sequence.

て、任意のトリプレックスを特異的に認識するフィンガーを作製しようという試みがなされている (11-14)。最も合理的な方法として、Pabo らはファージディスプレイシステムを導入した。それは、次のようなものである。Zif268 の三つの亜鉛フィンガーのうち、まずフィンガー 1 の認識ヘリックス上の鍵となるアミノ酸残基をランダム化しておき、この三フィンガー領域の遺伝子を繊維状ファージの表面コート蛋白質 DNA 内に組み込む。さまざまな Zif 変異体をその外殻蛋白質表面に発現させたファージのライブラリーの中から、目的の DNA 配列に結合するものだけをスクリーニングしてくる。この操作を繰り返し、残りのフィンガーにもあてはめることによって、任意の配列に最も親和性の高い蛋白質を選ぶことができる。実際に、TATA ボックス、p53 結合配列、核レセプターエレメントなどを標的とした、三個のフィンガーを有する新規亜鉛フィンガー型蛋白質が得られている (14)。

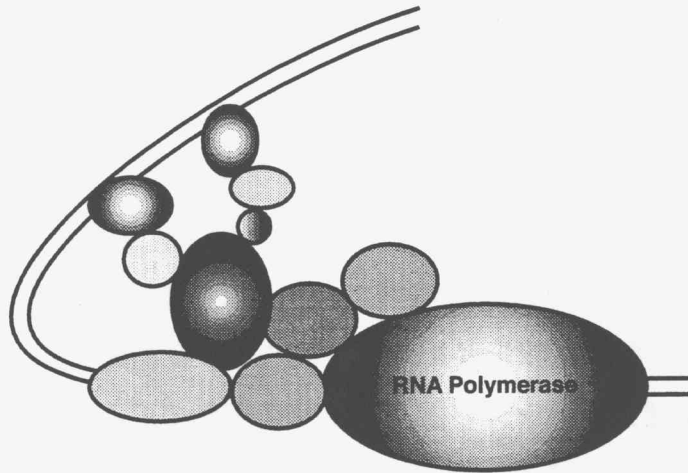
以上の三つの試みを組み合わせることによって、さらに変化に富んだ塩基配列を選択的かつ高親和性に認識できる新規亜鉛フィンガー型蛋白質が創製できると考えられる。

DNA 構造変化の制御

遺伝子の転写において、DNA の構造も重要な役割を担っている。DNA 結合蛋白質の結合によって生じる局所的な DNA 構造変化が転写開始複合体の形成に重要であり、また、転写因子により湾曲が引き起こされる DNA 部位を DNA 湾曲を有する既知の DNA 配列に置き換えても転写が進行することが示されている (15, 16)。従って、DNA の湾曲をコントロールすることは重要な意義を持ち、DNA 構造変化を誘発する分子は転写制御因子としての可能性を秘めている。

天然に存在する蛋白質が DNA に結合して DNA 構造変化を引き起こす場合、その要因となるのは、蛋白質分子中の芳香族アミノ酸残基が DNA の塩基対間にインターカレートした結果であることが多い。このような湾曲を引き起こす代表的なものには、HMG (high-mobility group) 蛋白質や TBP (TATA ボックス結合蛋白質) などがあげられる (17)。また、DNA リン酸バックボーンの電荷が局所的に中和されることによって DNA 湾曲が生じることが報告されている (18-20)。蛋白質中の塩基性アミノ酸の側鎖と DNA リン酸バックボーンとの静電相互作用が主な要因となるタイプ

(A)



(B)

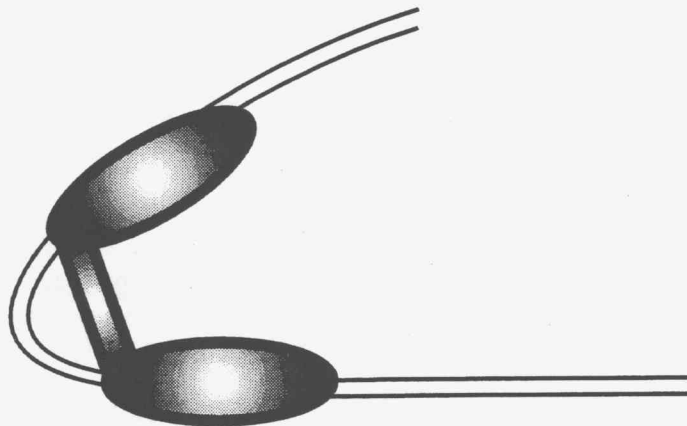


Figure 0-4 Schematic model of the transcriptional initiation complex. (A) Many proteins interact each other. DNA bending is important for the formation of the transcriptional initiation complex. (B) An artificial protein that induces DNA bending could be a useful tool for the regulation of transcription.

の湾曲は、bZIP (21-24)、*Escherichia coli* CAP (25)、*Saccharomyces cerevisiae* MATa1/MAT α 1 ホメオドメイン蛋白質 (26) などによって誘発される。しかしながら、DNA 湾曲を誘発するために、蛋白質の DNA 結合様式を局所的に改変するのは困難である。そこで本研究では、亜鉛フィンガー間のリンカーを通常よりも柔軟で長いものにすることによって、離れた二つの蛋白質結合配列間で DNA の湾曲を誘発できないかと考え、数種類の新規 6-亜鉛フィンガー型蛋白質を創製した。これらの DNA 結合様式に関して報告する。

また、DNA 湾曲構造の安定性が転写効率に影響を与えていることを示唆する報告 (27) があることから、DNA 構造変化を引き起こす 6-亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 結合における速度論的側面を解析することも、転写制御にむけて重要であると考えた。そこで、6-亜鉛フィンガー蛋白質のリンカー領域の電荷を変えた新規蛋白質を創製し、その DNA 結合様式、DNA 構造変化への影響及び、DNA 結合の速度論的特性を解析した。

第一章

ポリグリシンリンカーを有する

新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 湾曲の誘発

遺伝子の転写は蛋白質の配列特異的な DNA 結合のみならず、離れた塩基対間に存在する蛋白質同士の相互作用によって初めて開始される。この蛋白質間の相互作用を可能にするのは、DNA の構造変化であり、DNA 湾曲を誘発する新規蛋白質は、人工転写制御因子としての可能性を秘めていると考えられる。二つのトリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドをリンカーを介して連結させることによって、離れた二つの結合配列間にリンカー長に依存した湾曲を誘発する試みは既に報告されている (28, 29)。しかし、トリプルヘリックスは極めて限られた配列でしか形成されない。一方、亜鉛フィンガー蛋白質はこれまでのファージディスプレイ法を用いた結合配列の選択の成功に示されるように、様々な配列に対応しうることが示唆されている。それ故、亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 構造変化は多様な配列選択性を持ち得る。また、亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 結合様式は、トリプルヘリックスに比べて自由度が高いため、蛋白質を材料として、リンカーペプチド長と誘発される DNA 構造変化の関係を考察するのは興味深い。

第一節 新規 DNA 湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製

転写因子 Sp1 の DNA 結合領域 (Sp1(530-623)) にはタンデムに連なる三つの C2H2 型亜鉛フィンガーモチーフが存在し、5'-GGGGCGGGGC-3' という G、C に富んだ塩基配列 (以下 GC ボックスと記す) に結合することが知られている (30) (Figure 1-1)。天然における C2H2 型亜鉛フィンガー蛋白質のリンカーの保存配列は TGEKP であり、三つの亜鉛フィンガーモチーフを有する Sp1(530-623) 同士を TGEKP リンカーで連結した人工蛋白質 Sp1ZF6 は連続する二つの GC ボックスに結合することが明らかとなっている (6)。本研究では、離れた二つの GC ボックス間に DNA 構造変化を誘発することを目的として、三つの亜鉛フィンガーモチーフを有する Sp1(530-623) 同士を長さの異なるリンカーで連結することにより、新規 6-亜鉛フィンガー型蛋白質を創

製した。リンカーには、最もフレキシブルであると考えられるポリグリシンを導入し、そのグリシンの数は4、7、及び10の三種類のものを創製し、それぞれ、Sp1ZF6(Gly)4、Sp1ZF6(Gly)7、Sp1ZF6(Gly)10とした (Figure 1-2)。

一方、標的とする DNA 配列として、二つの GC ボックスが、DNA 二重らせんの約 1 ヘリカルターンに相当する 10 塩基対離れて存在している配列を選んだ。三つの亜鉛フィンガーモチーフを有する Sp1(530-623)は、DNA の主溝に沿って結合することから、6-亜鉛フィンガー蛋白質内の二つの DNA 結合ユニットは、この離れた二つの GC ボックスに対して、同じ位相を有しているものと想定した。DNA の配列自体に由来する DNA 構造、及び DNA 構造変化の影響を考慮し、二つの GC ボックス間の配列は、四塩基混在配列 (mix) 及び、AT に富む配列 (at) の二種類を用いて実験を行った。これらを、GCmixGC、及び GCatGC と表す (Table 1-1)。また、コントロール配列として、6-亜鉛フィンガー蛋白質のリンカー長がいずれの場合であっても、六つの亜鉛フィンガーのうち、三つの亜鉛フィンガーモチーフのみを使って DNA に結合している状態を形成するために、GC ボックスを一つしか含まない DNA 配列を用意した。これらを、MIXmixGC、及び MIXatGC と表す (Table 1-1)。

Table 1-1 DNA sequences for binding of 6-zinc finger proteins

GCatGC	5'-GGGGCGGGGC TATAATTATA GGGGCGGGGC-3'
GCmixGC	5'-GGGGCGGGGC TACGAGTCCA GGGGCGGGGC-3'
MIXatGC	5'-ACTGGTCAAC TATAATTATA GGGGCGGGGC-3'
MIXmixGC	5'-ACTGGTCAAC TACGAGTCCA GGGGCGGGGC-3'

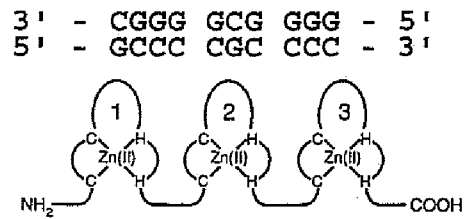


Figure 1-1 Schematic representation of sequence specific DNA binding of Sp1(530-623).
 The DNA binding domain of transcription factor Sp1 has 3-zinc finger motifs and binds to GC rich sequence (GC-box).

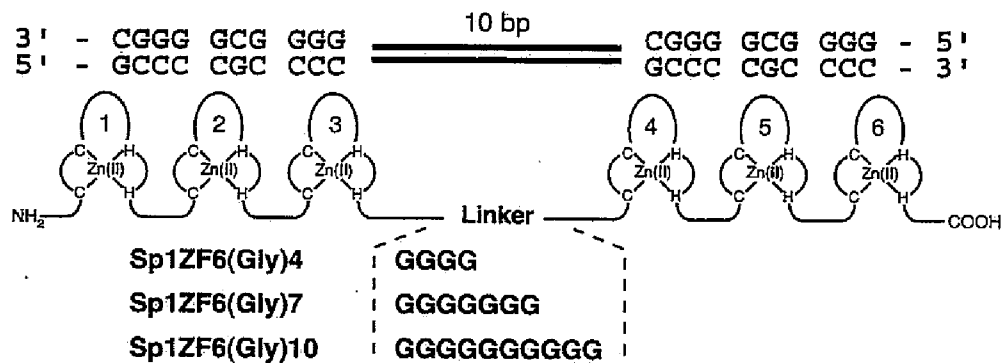


Figure 1-2 Schematic representation of artificial proteins Sp1ZF6(Gly)4, Sp1ZF6(Gly)7, and Sp1ZF6(Gly)10.

第二節 リンカーの長さの違いによる結合様式の違い

ポリアクリルアミドゲル電気泳動における DNA の移動度は、一般的に塩基対数に依存すると同時に、その構造やフレキシビリティに依存し、DNA フラグメントの両末端間の距離の平方根の大きさに依存することが知られている (31)。Figure 1-3 に示すように、中心付近に動きにくい構造や湾曲構造を有する DNA フラグメントは、湾曲構造が少なく動きやすい DNA フラグメントに比べると遅く泳動する。それ故、各蛋白質が結合した DNA フラグメントの移動度を比較することにより、蛋白質-DNA 複合体の形状の違いが検出できる。MIXmixGC 配列を含む 112 塩基対の DNA フラグメントと各 6-亜鉛フィンガー蛋白質との反応溶液を、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動したところ、蛋白質結合バンドの移動度は各 6-亜鉛フィンガー蛋白質のリンカー長の違いによらず等しくなった (Figure 1-3A)。これは、リンカーの長さの異なる三つの 6-亜鉛フィンガー蛋白質の分子量の違いが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動における DNA フラグメントの移動度に影響を与えないことを示唆している。一方、GCmixGC 配列を含む 112 塩基対の DNA フラグメントと各 6-亜鉛フィンガー蛋白質とを反応させた場合の蛋白質結合バンドの移動度は、Sp1ZF6(Gly)7 と Sp1ZF6(Gly)10 では一致したが、Sp1ZF6(Gly)4 の結合バンドの移動度は他の二つよりも大きくなった (Figure 1-3B)。この結果は、10 bp 離れた二つの GC ボックスへの蛋白質の結合状態が、Sp1ZF6(Gly)4 と Sp1ZF6(Gly)7、Sp1ZF6(Gly)10 とでは異なっていることを示している。DNA 湾曲の有無に関してはこの結果からでは明らかにならないが、少なくとも Sp1ZF6(Gly)4 が結合した時の DNA の状態は、他の二つの蛋白質が結合した場合に比べて、よりフレキシブルであることが示唆される。Sp1ZF6(Gly)4 はリンカーが短いために、離れた二つの GC ボックスの両方に結合することができず、一方の GC ボックスにしか結合することができないのかもしれない。

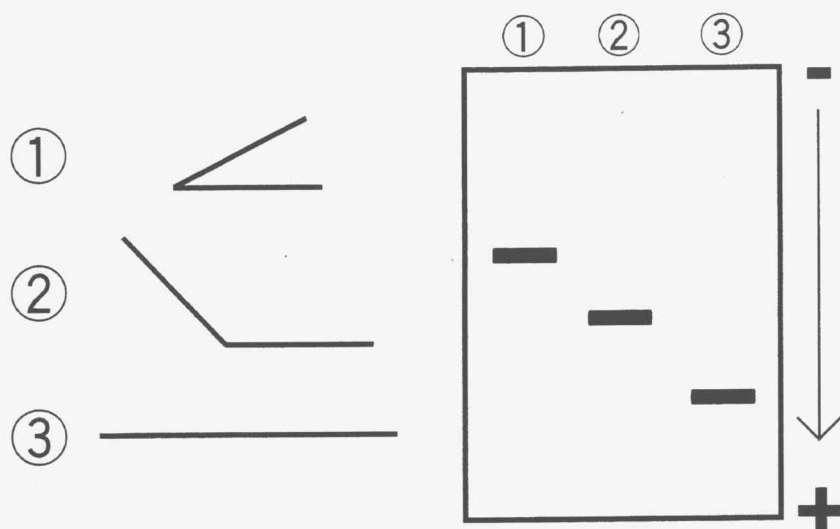


Figure 1-3 The electrophoretic mobility of a DNA fragment in a polyacrylamide gel. The electrophoretic mobility of a DNA fragment in a polyacrylamide gel depends on the mean square end-to-end distance for the fragment and/or the DNA flexibility. A DNA fragment with a stiff or bent structure in the neighborhood of its center migrates more slowly than a flexible and straight DNA fragment with the same bp.

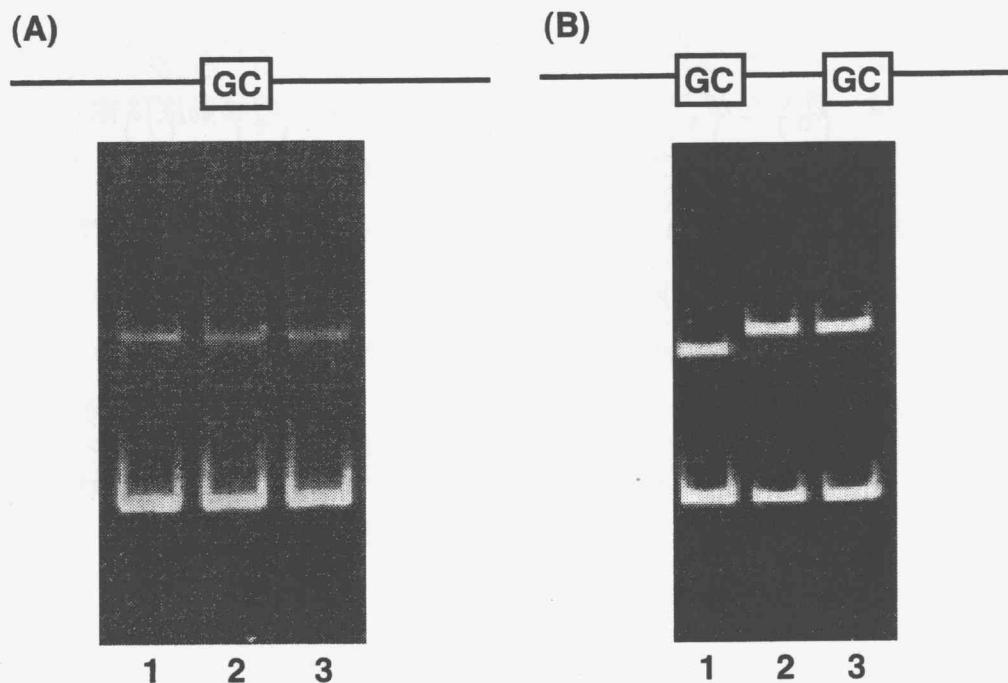


Figure 1-4 Gel mobility shift assays of Sp1ZF6(Gly)*n*. Sp1ZF6(Gly)*n* binds to a single GC box (A) and two separated GC boxes, GCmixGC sequence (B). The lower and upper bands indicate protein-free and protein-bound DNA fragments, respectively. Lanes 1, 2, and 3: Sp1ZF6(Gly)4, Sp1ZF6(Gly)7, and Sp1ZF6(Gly)10, respectively.

第三節 DNA 構造変化の検出

Sp1ZF6(Gly)7 と Sp1ZF6(Gly)10 が結合した時、二つの GC ボックス間に DNA 構造変化が生じているのかどうかを調べるために、ヒドロキシルラジカルフットプリンティングを行った。この手法は、DNA の溝にはまり込んだ[EDTA•Fe(II)]錯体が、過酸化水素と反応し、発生するヒドロキシルラジカルを利用している。発生したラジカルは、DNA の配列非依存的に DNA のマイナーグループ側からデオキシリボース環の C4'を攻撃する (32, 33)。これによって、DNA バックボーンが切断される。それ故、この保護法は蛋白質結合領域を同定するだけではなく、DNA の構造変化を敏感に検出する手法として知られている (34, 35)。

GCmixGC 配列に、三つの 6-亜鉛フィンガー蛋白質及び、コントロールとして三つの亜鉛フィンガーモチーフを有する Sp1(530-623)が結合した状態でヒドロキシルラジカルによる切断反応を行った。実験には、グアニン塩基に富む DNA 鎖の 5'末端を ^{32}P で標識した GCmixGC 配列を含む 48 bp の二本鎖 DNA を基質として用い、また、DNA への結合反応に使用した蛋白質の濃度は 0, 25, 100 nM である。全ての蛋白質の結合反応溶液において、100 nM の条件では遊離の DNA が検出されず、また、Sp1(530-623)は DNA に二分子が結合している状態であることを、ゲルシフト法により確認している。Figure 1-5 より、3 フィンガー Sp1ZF6(530-623)、及び Sp1ZF6(Gly)4 が結合した場合は二つの GC ボックス間に切断強度の変化が見られないのに対し、Sp1ZF6(Gly)7、及び Sp1ZF6(Gly)10 が結合した場合には、二つの GC ボックス間の配列中に、強い切断活性が認められた。Figure 1-6 は切断パターンを示している。Sp1ZF6(Gly)7 と Sp1ZF6(Gly)10 が結合した場合には、二つの GC ボックス間の 5'-TA-3' 配列に特に強い切断が生じていることが明らかになった。これは、Sp1ZF6(Gly)7、及び Sp1ZF6(Gly)10 が二つの GC ボックス配列に結合することによって、その間に存在する 5'-TA-3' 配列のマイナーグループが広がり、ヒドロキシルラジカルの攻撃を受けやすくなったことが原因であると考えられる。すなわち、DNA のメジャーグループ側への湾曲が生じていることが示唆される。また、Figure 1-5 より、強切断が生じている DNA のバンドは、蛋白質非存在下における対応する切断バンドより移動度が小さいことがわかる。切断産物の 3'末端の修飾が異なっている可能性がある (36)。

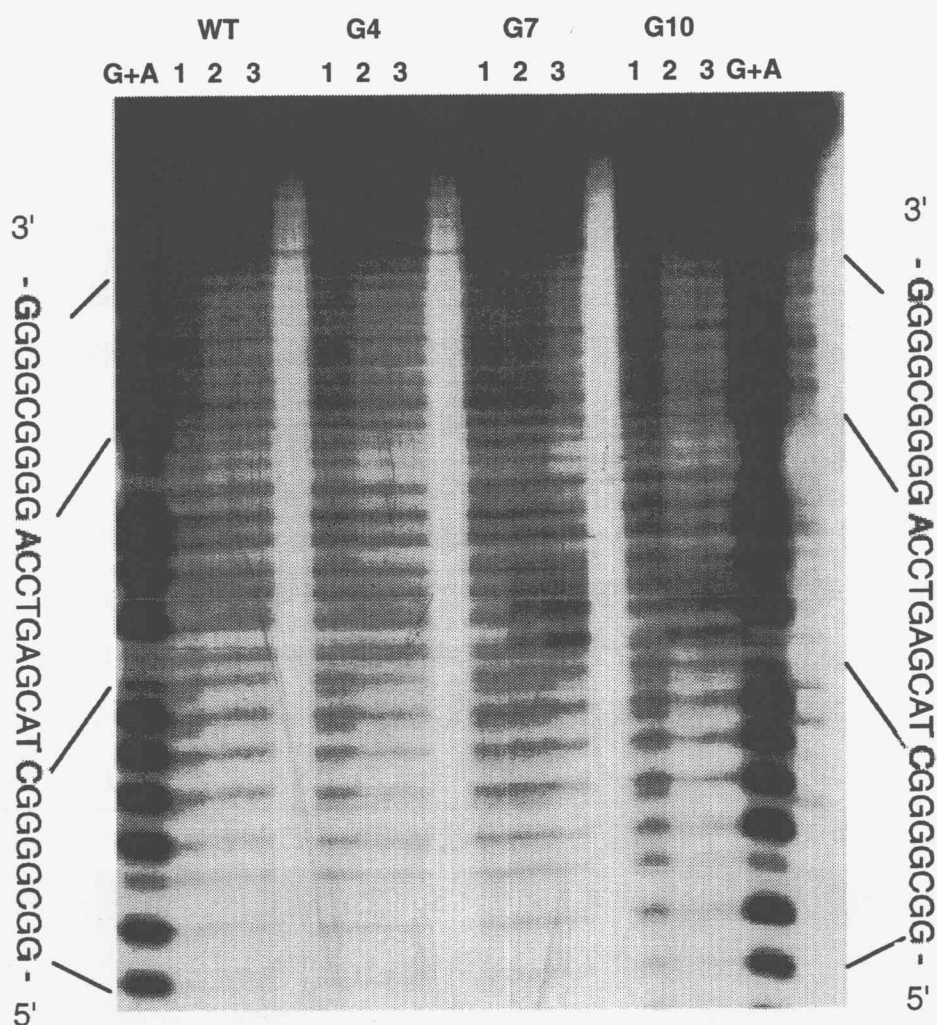


Figure 1-5 Cleavage patterns by hydroxyl radicals. The target DNA fragment contained GCmixGC sequence. The panel shows the results for the G-strand. The complex with Sp1(530-623), Sp1ZF6(Gly)4, Sp1ZF6(Gly)7, or Sp1ZF6(Gly)10 was attacked by hydroxyl radicals. The samples contained the following concentrations of peptides: lanes 1, 2, and 3: 0, 25, and 100 nM, respectively. The first and last lanes indicate G+A of the Maxam-Gilbert sequencing reactions.

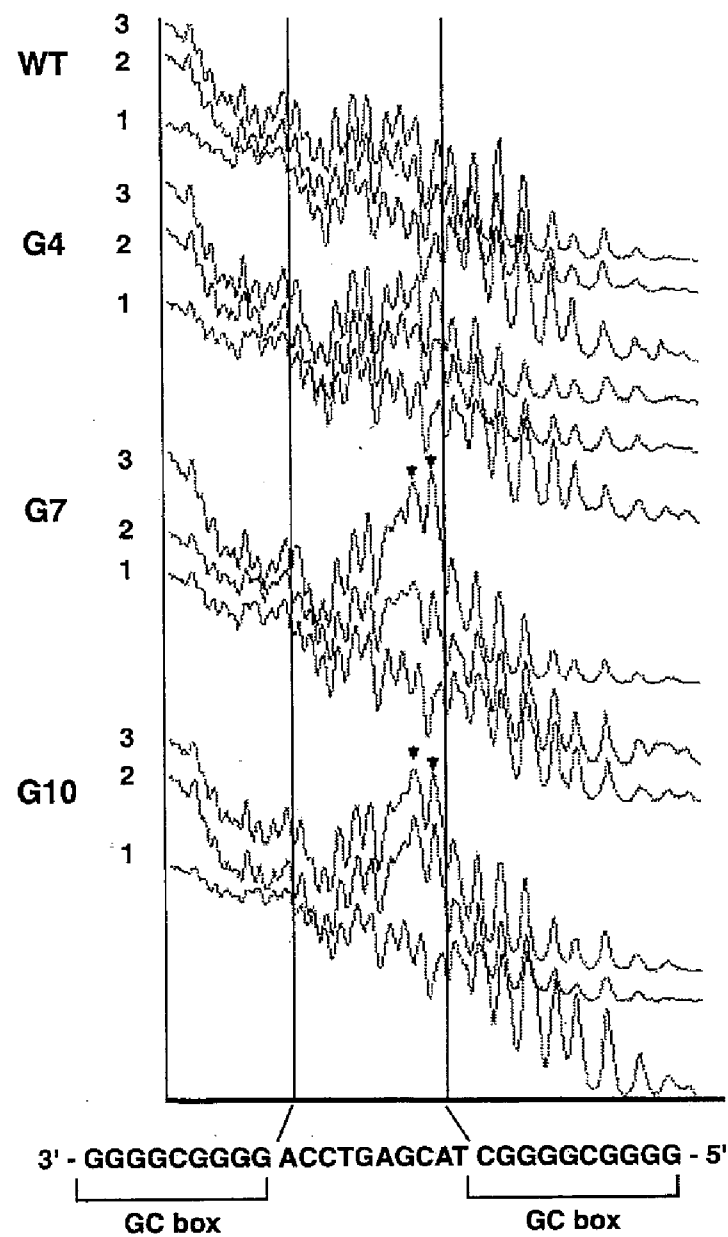


Figure 1-6 Line scans corresponding to tracks on the gel of the hydroxyl radical footprinting assay in Figure 1-5. Lanes 1, 2, and 3: 0, 25, and 100 nM of each peptide, respectively. Arrows indicate the hypersensitive cleavage nucleotides.

この結果より、Sp1ZF6(Gly)7、及び Sp1ZF6(Gly)10 の結合に伴って、糖のコンフォメーションに変化が生じていることも示唆される。

第四節 Phasing Analysis による DNA 構造変化の解析

DNA 湾曲の大きさと方向を検討するために、Phasing Analysis を行った。これは Crothers らによって開発された方法 (37) で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動における DNA フラグメントの移動度の変化を利用して、DNA の構造変化を最も高感度で検出する手法の一つである。その原理を Figure 1-7 に示す。配列自体に湾曲を有することが知られている poly AT tracts からなる配列と調べる対象となる蛋白質結合配列との間に、DNA の約 1 ヘルカルターンにわたって、少しずつ長さの異なるスペーサー配列を挿入する (Figure 1-7A)。蛋白質結合サイトで湾曲が生じている場合には、スペーサー配列長の増加に伴い、フラグメントの末端は 360° 回転する (Figure 1-7B)。poly AT tracts の湾曲に対する蛋白質結合サイトでの湾曲が同位相になったとき (Figure 1-7C)、フラグメント全体の湾曲は最大となり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動においては最小の移動度を示す。また、逆位相になったときには (Figure 1-7D)、フラグメント全体の湾曲は打ち消され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の移動度は最大となる。その結果、スペーサー配列長の変化に伴う移動度の変化は、同位相または逆位相になったときの移動度を振幅とするコサインカーブを描く。振幅の大きさが蛋白質結合サイトにおける湾曲の大きさを、また、位相が湾曲の方向性を反映する。

Figure 1-8 は構築した Phasing Analysis 用のプラスミド DNA を示している。既知の湾曲を有する配列として、64 bp の六つの連続する poly AT tracts を挿入した。(A/T)₆ から成る poly AT tract は DNA マイナーグループ側に 18° の湾曲を有し、六つの連続する poly AT tracts は、全体として DNA メジャーグループ側への 108° の湾曲を有することが知られている (38)。また、蛋白質結合配列としては、Table 1-1 に記した四種類の配列を使用した。poly AT tracts と蛋白質結合配列間のスペーサーの長さは、8 bp から 18 bp まで、2 bp ずつ増加させた六種類を用意した。また、この六種類のフラグメントのスペーサーの長さの違いが電気泳動に反映しないよう、poly AT tracts 配列

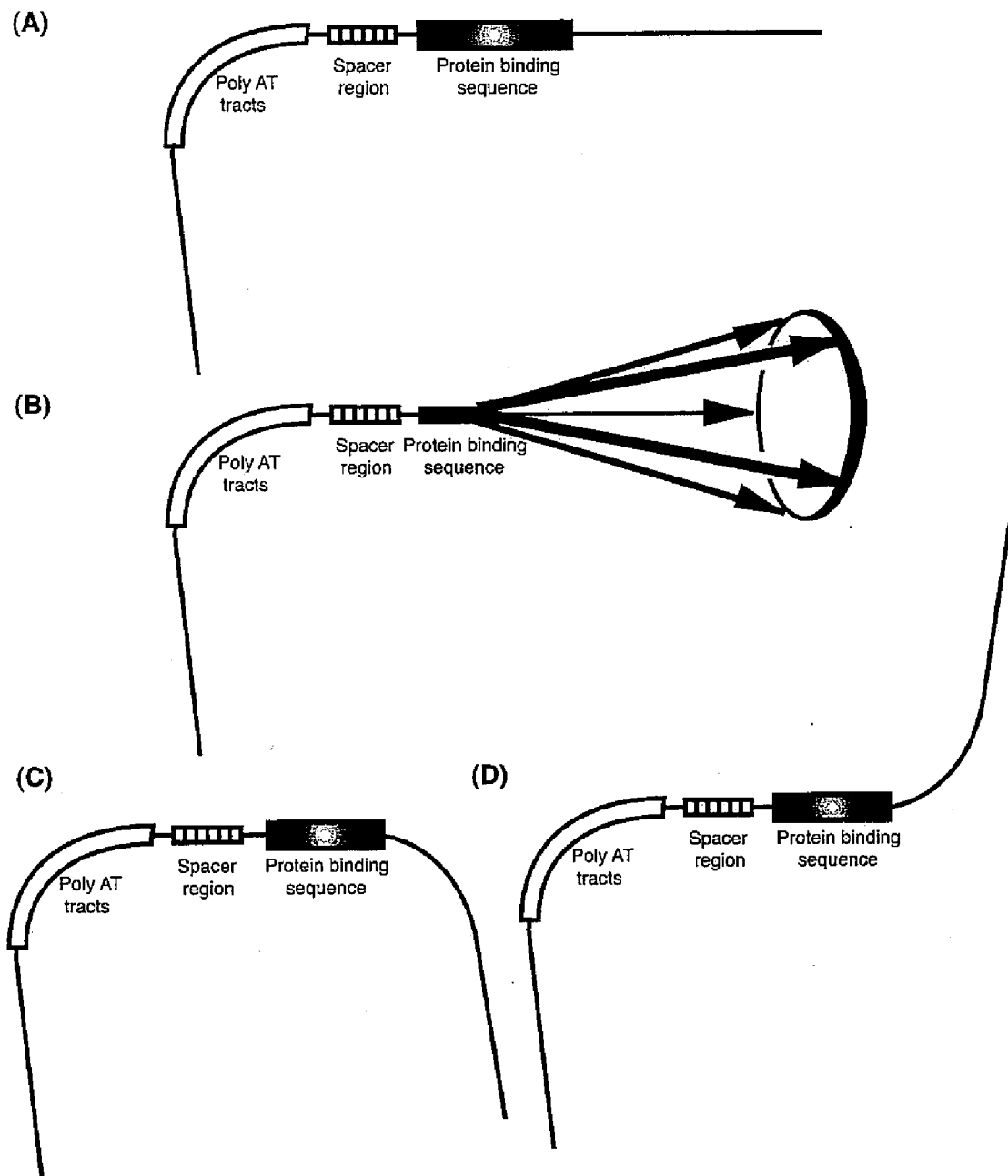


Figure 1-7 The principle of the phasing analysis. (A) Schematic model of the DNA fragment used for phasing analyses. The sequence of 6-poly AT tracts was used as a reference bending. The spacing between poly AT tract and the protein binding sequence was varied. (B) The position of the end of each fragments is varied corresponding to the spacing, if DNA bending occur at the protein binding sequence. The overall structure of a set of DNA fragments changes from 'in-phase isomer' to 'out of-phase isomer'. (C) Schematic model of 'in-phase isomer'. The electrophoretic mobility becomes slowest. (D) Schematic model of 'out of-phase isomer'. The electrophoretic mobility becomes fastest.

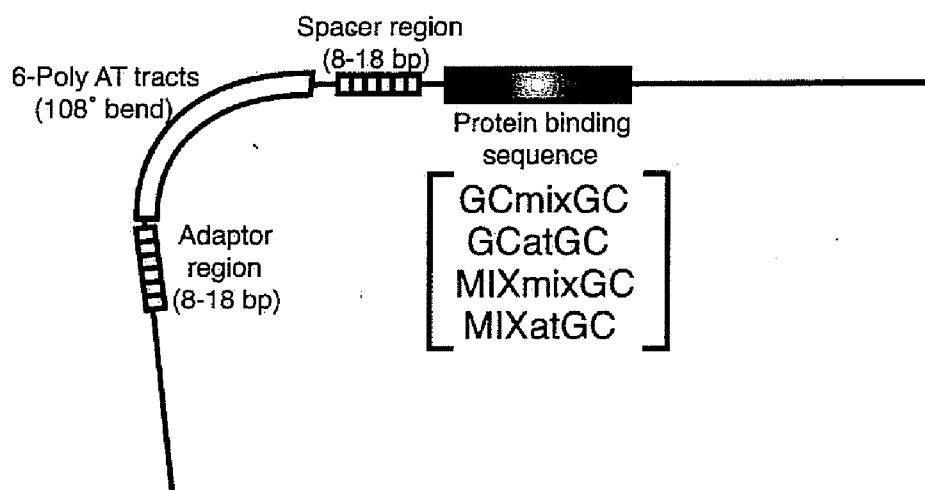


Figure 1-8 Structure of the DNA fragment used for the phasing analysis and the sequences (see Table 1-1) used for the protein binding site. A variable spacer region from 8 to 18 bp in increments of 2 bp is placed between the protein binding sequence and the permanent bend resulting from six consecutive phased AT tracts that has 108° bend toward DNA major groove. A variable adaptor region from 18 to 8 bp is placed corresponding to the length of the spacer region to conserve the total length of each DNA fragment 467 bp. The sequence described above is inserted to multi-cloning site of pUC19, and PvuII cleavage produces the 467 bp fragment.

の隣(スパーサー領域とは反対側)に 18 bp から 8 bp までスパーサー長に対応して 2 bp ずつ減少させたアダプター配列を挿入し、全体の基質 DNA のフラグメント長を統一した。実験は、これらのプラスミドを制限酵素 *PvuII* で切断することによって生成される、poly AT tracts、スパーサー配列、及び蛋白質結合配列を含む 467 bp の DNA フラグメントを基質として行った。また、蛋白質の濃度は、遊離の DNA と蛋白質結合 DNA の両者が同時に検出される濃度で行った。また、3-フィンガー Sp1(530-623)は二つの GC ボックスを有する配列に対して一分子結合状態と二分子結合状態の二つの状態をとりうるため、これらの二つの状態での DNA 構造変化を検出するために、低濃度、及び高濃度の二種類の濃度で結合反応を行った。なお、このプラスミドの系が Phasing Analysis における解析に妥当であることを確かめるために、蛋白質結合配列のかわりに、27 bp から成る三つの poly AT tracts 配列を挿入した、スパーサーの長さが異なる一連のプラスミドを作製した。三つの poly AT tracts 配列はその中心でマイナーグループ側に 54° の湾曲を有することが知られている (38)。Phasing Analysis の結果、六つの poly AT tracts 配列の湾曲と三つの poly AT tracts 配列の湾曲が強め合うのは、この二つの湾曲の中心間の距離が 5.5 ヘリカルターンになる時であることが明らかとなった。この結果は、これら二つ配列の湾曲の方向が互いに逆であることを意味し、これまでの知見と一致した。すなわち、Phasing Analysis に用いたフラグメント内の塩基配列に、検出したい領域の湾曲の方向性に関する情報に強く影響を与えるような配列は内在していないものと考えられる。

Figure 1-9 はスパーサーの長さが異なる一連の基質を用いて蛋白質との結合反応を行ったときの、ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示している。遊離の DNA フラグメントも、スパーサーの長さの違いによって異なる電気泳動の移動度を示すことが明らかとなった。これは、用いた全ての蛋白質結合配列において見られ、DNA フラグメントがその配列に依存する湾曲構造を有していることが示唆される。一方、蛋白質の結合バンドの移動度もまた、スパーサー長の変化に伴い変化した。その変化の度合いを解析するために、各シフトバンドの移動距離を見かけの塩基対数に変換し、その平均塩基対数を基準として、各相対移動度を算出した。スパーサー長の異なる六つの DNA フラグメントの各相対移動度は、スパーサー長に対するコサイン関数で表されることが知られている (39)。Figure 1-10 はスパーサー長を横軸、相対

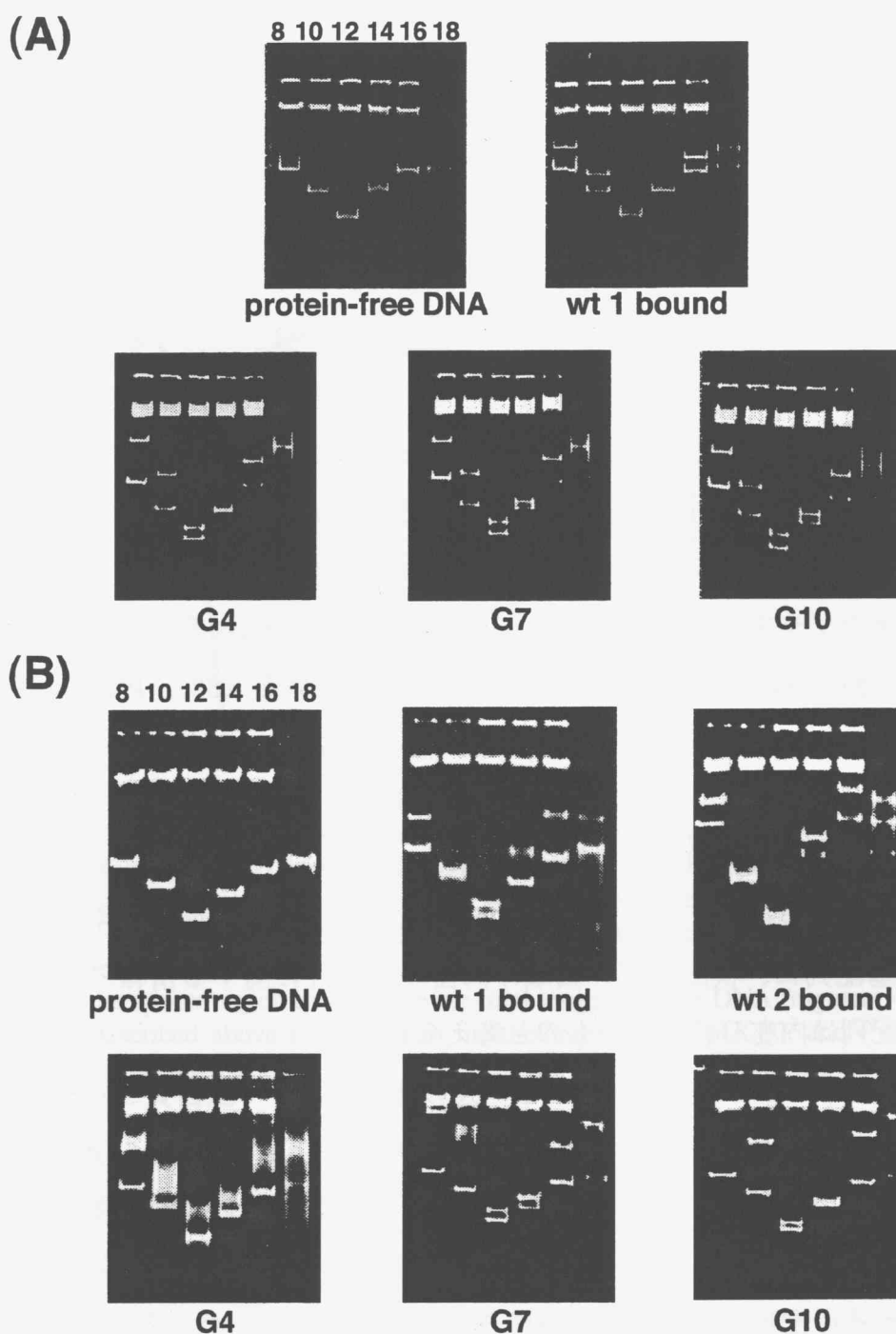


Figure 1-9 Electrophoretic patterns of phasing analysis. Each DNA fragment was incubated with wtSp1(530-623), Sp1ZF6(Gly)4, Sp1ZF6(Gly)7, or Sp1ZF6(Gly)10 and electrophoresed. The protein binding sequences were 'MIXmixGC' (A) and 'GCmixGC' (B), respectively. The numbers at the top of each figure mean the length of spacing in bp between the reference bending sequence and the protein binding sequence.

移動度を縦軸とするコサインカーブである。振幅の大きさは湾曲の大きさを、また、位相は湾曲の方向を示す。

Figure 1-10A、10B から、GC ボックスを一つしか含まない配列は、配列に依存する何らかの DNA 構造を有しており、蛋白質の結合によって若干その構造が変化することが示唆された。この結果は、転写因子 Sp1 の三つの亜鉛フィンガー領域が DNA に結合した時、何らかの DNA 構造変化が生じているという報告 (40-43) と一致する。また、蛋白質の結合による DNA 構造変化の度合いは、フィンガーの数やリンカーの長さによらずほとんど等しいことが明らかになった。この傾向は MIXmixGC 及び MIXatGC のどちらを基質とした場合にも共通して見られ、GC ボックスに隣接する配列に依存しないことが示唆された。一方、10 bp 離れた二つの GC ボックスを有する配列を用いて Phasing Analysis を行った場合も、配列に依存する DNA 構造が検出され、蛋白質の結合によってその構造が変化することが示唆された。しかしながら、GC ボックスを一つしか含まない配列の場合とは異なり、蛋白質の種類によって異なる構造変化を誘発することがわかった (Figure 1-10C、10D)。

各蛋白質が誘発する DNA 構造変化の違いを比較するために、3-亜鉛フィンガー Sp1(530-623)が二分子結合し、位相が 0 (すなわち、poly AT tracts の湾曲に対する蛋白質結合サイトでの湾曲が同位相) になるスペーサー長を基準においた。このとき、各蛋白質が誘発する DNA 構造変化の大きさを Figure 1-11 の円グラフで示した。Phasing Analysis において、基準となるスペーサー長をもつフラグメントに各蛋白質が結合したときに、フラグメントの末端が存在すると想定される位置をプロットで表す。円の中心から各プロットまでの距離は、コサインカーブにおける振幅の大きさ、すなわち DNA 湾曲の大きさを示す。また、プロットの位相は、DNA 湾曲の方向を反映しており、3-亜鉛フィンガー Sp1(530-623)が二分子結合した場合に生じる構造変化の方向とのずれの大きさを意味する。DNA 湾曲の大きさに関して、Sp1ZF6(Gly)10 及び Sp1ZF6(Gly)7 は Sp1(530-623)二分子の結合によって引き起こされる構造変化の大きさとほとんど同じ大きさの湾曲を誘発することが示唆された。しかしながら、その構造変化の方向は等しくなく、Sp1(530-623)二分子の結合の場合と比べて、Sp1ZF6(Gly)7 の方が Sp1ZF6(Gly)10 よりもより大きな方向の変化を引き起こすことがわかった。これら傾向もまた、MIXmixGC 及び MIXatGC のどちらを基

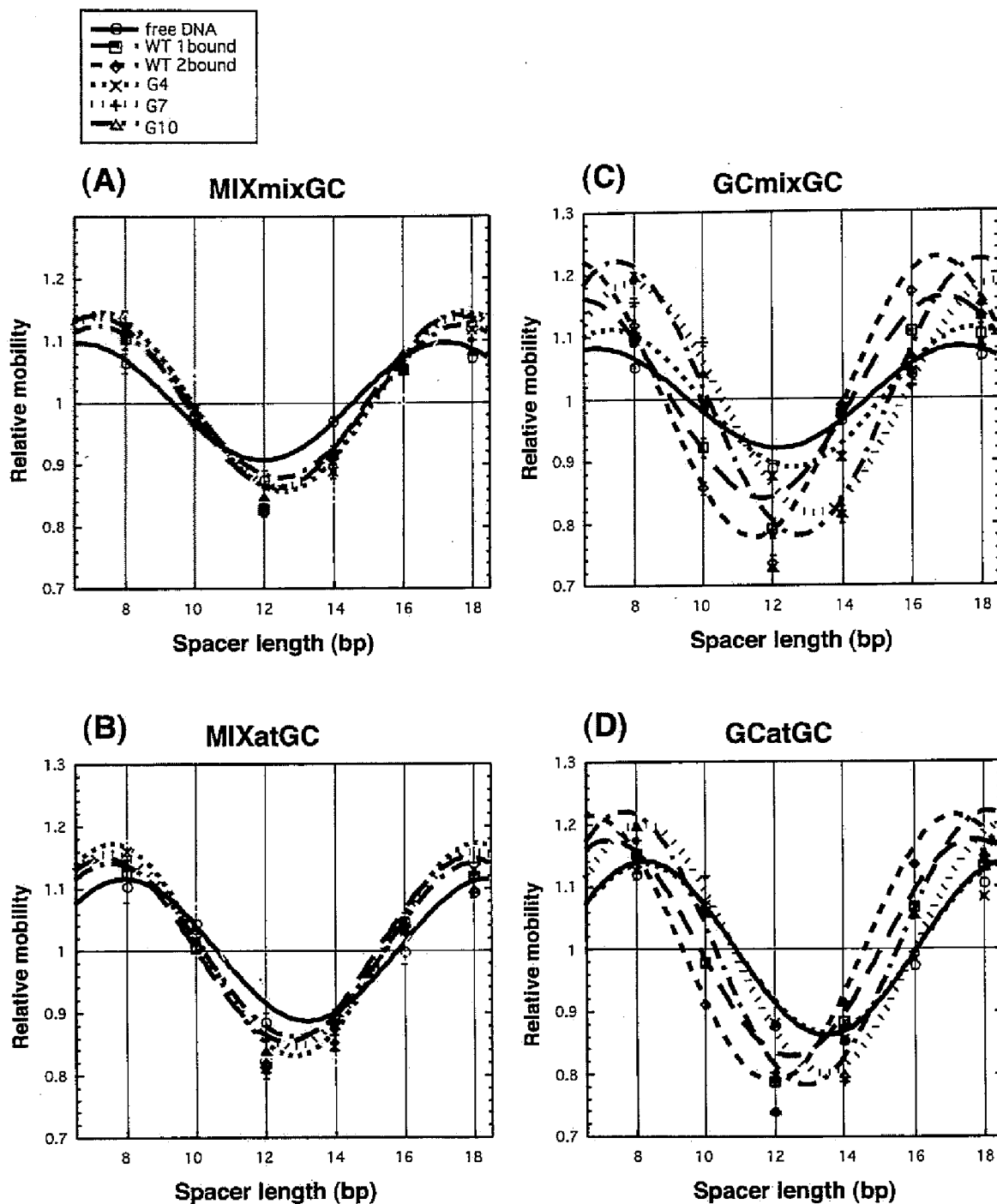


Figure 1-10 Plot of relative mobility versus spacer length. The data of phasing analysis shown as figure 9 were analysed by converting each mobility to the corresponding relative mobility and plotted against the spacer length. The amplitude and the phasing obtained from the fitted cosine curves reflect the overall bending magnitude and the bending direction of the protein binding site, respectively. The protein binding sequences were 'MIXmixGC' (A), 'MIXatGC' (B), 'GcmixGC' (C), and 'GCatGC' (D).

質とした場合にも共通して見られ、GC ボックスに隣接する配列に依存しないことが示唆される。一方、Sp1ZF6(Gly)4 に関しては、湾曲の大きさ、方向とも Sp1(530-623) が一分子または二分子結合した場合と一致しなかった。Phasing Analysis においてスミアバンドが検出されることから、離れた二つの GC ボックスに安定に結合できていない可能性が示唆される。離れた二つの GC ボックスに結合した、二分子の 3-亜鉛フィンガー Sp1(530-623)を、仮想的に極めて自由度の高いリンカーで連結された位置分子の 6-亜鉛フィンガー蛋白質であると仮定すると、Sp1ZF6(Gly)7 及び Sp1ZF6(Gly)10 の結合によって生じた DNA 構造変化の方向性の違いは 6-亜鉛フィンガー蛋白質のリンカー部分に起因すると考えられる。リンカーがない場合と比べて、リンカーの長さが短い方が、大きな方向性の変化を引き起こすことが示唆された。

トリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドの結合による DNA 構造変化の誘発の場合 (28, 29)、結合サイト間の中心でマイナーグループ側への湾曲が誘発され、また、二つのトリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドを連結するリンカーの長さは、生じる DNA 湾曲の大きさに影響を与えることが既に報告されている。Sp1ZF6(Gly)n はトリプルヘリックス形成オリゴヌクレオチドと同様に DNA のメジャーグループに結合するが、DNA 湾曲の場所は二つの GC ボックス間の配列の中心から 5'方向にずれた領域であり、マイナーグループが広がるような構造変化を誘発することが示唆された。Sp1(530-623)は三つの亜鉛フィンガーモチーフを使って、約 10 bp から成る GC ボックス配列を認識するが、フィンガー 1 の寄与は他の二つのフィンガーよりも小さいことが知られている (44)。さらに、フィンガー 1 の欠失変異体でも、GC ボックス配列に結合できることが確かめられている (44)。このことから、Sp1ZF6(Gly)7、Sp1ZF6(Gly)10 は二つの GC ボックス結合ドメインを有しているが、その結合様式、親和性は必ずしも等価ではない可能性がある。非対称な結合状態の結果、DNA 構造変化の中心のずれが生じたのかもしれない。水素結合により、一対一の対応関係で認識を行うトリプルヘリックスとは異なる構造変化が生じるのも、結合様式の違いに起因していると考えられる。

局所的な DNA 構造変化の方向は、DNA 全体構造に影響を与え得る。転写因子ベータシクロイシンジッパー蛋白質二量体は AP-1 サイトと呼ばれる DNA 配列に結合し、DNA 構造変化を誘発するが、その DNA 構造変化の方向は二量対ペプチドの種

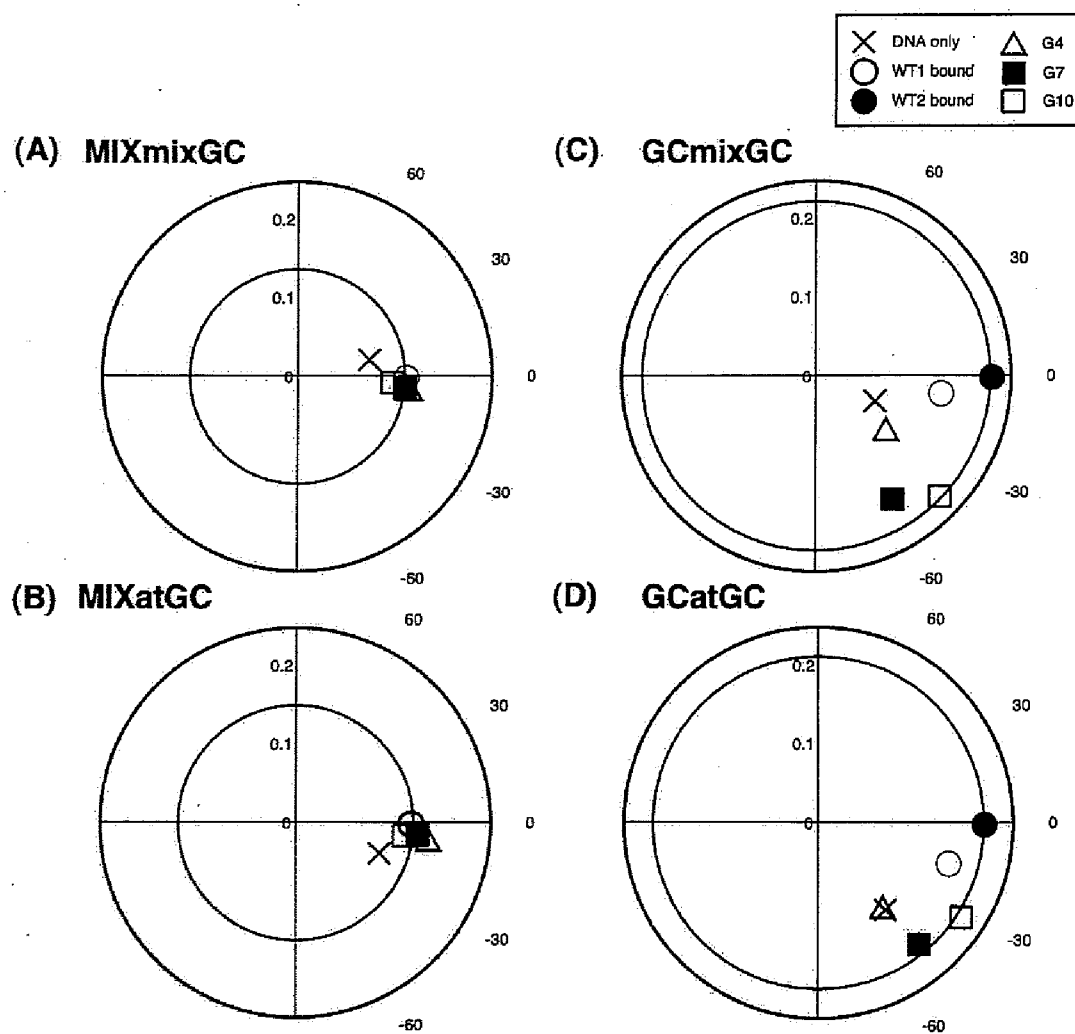


Figure 1-11 Relative end position of phasing DNA fragments containing 'MIXmixGC' (A), 'MIXatGC' (B), 'GCmixGC' (C), and 'GCatGC' (D) sequences, respectively, in DNA bending. The complete binding of Sp1(530-623) is the standard position. The distance from the center to each plot and the deviation from the x-axis reflect the overall bending magnitude and the relative entire bending direction, respectively.

類によって異なることが報告されている (39, 45)。本研究は、DNA 湾曲の方向変化による遺伝子発現の制御に向けた蛋白質設計にとって、有用な知見を与えると考えられる。

第二章

電荷の異なるリンカーを有する

DNA 湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製：

DNA 結合における速度論的特徴

DNA の湾曲構造は転写開始複合体の形成などさまざまな生体反応において重要な役割を果たしている。さらに、DNA 湾曲を誘発する HMG 蛋白質の DNA 結合に関する研究から、湾曲した DNA 構造の速度論的安定性も、転写の効率に影響しているという報告がなされている (27)。したがって、DNA 湾曲を誘発する蛋白質の DNA 結合における速度論的特性を調べることは、転写の制御に向けても大きな意味を持つと考えた。

第一節 電荷を有する 6-亜鉛フィンガー蛋白質の創製

10 個のグリシン残基をリンカーに有する 6-亜鉛フィンガー型蛋白質 Sp1ZF6(Gly)10 は 10 bp 離れた二つの GC ボックスに結合し、DNA 構造変化を引き起こすことが第一章からも示唆された (46)。このリンカーペプチドの残基数は 10 残基に保ち、DNA のリン酸バックボーンと相互作用する可能性のある、グルタミン酸、アルギニン、といった電荷をもつアミノ酸を有するリンカー配列、GGEGEGEGEQ、または GGRGRGRGRQ を導入した新規蛋白質 Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 を作製した (Figure 2-1)。これらの結合によって誘発される DNA 構造変化と、これらの DNA 結合における速度論的特性を、リンカー部分の電荷およびフレキシビリティの違いの観点から、Sp1ZF6(Gly)10 と比較した。標的とする DNA 配列は、10 bp 離れた二つの GC ボックス配列、GCmixGC および GCatGC (Table 1-1) を用いた。

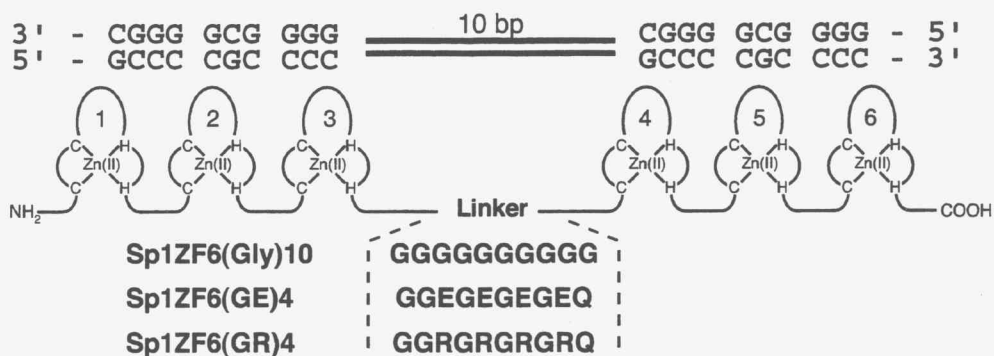


Figure 2-1 Schematic representation of Sp1ZF6(Gly)10, Sp1ZF6(GE)4, and Sp1ZF6(GR)4.

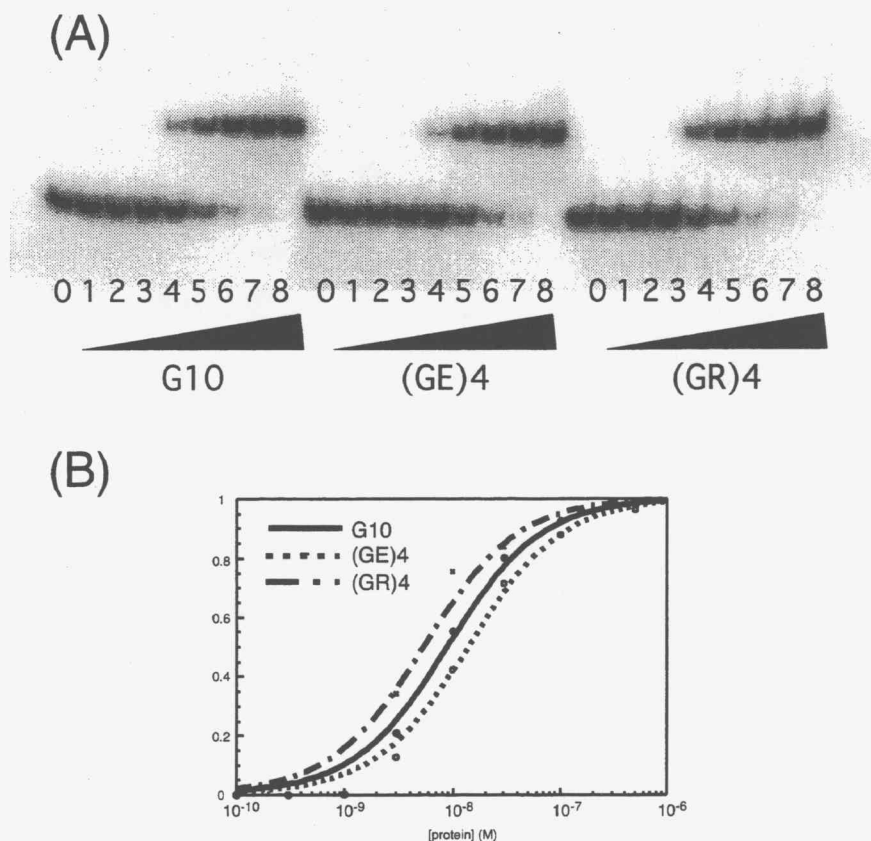


Figure 2-2 (A) Gel mobility shift assays for Sp1ZF6(Gly)10, Sp1ZF6(GE)4, and Sp1ZF6(GR)4 bindings to the GCmixGC sequence. Lanes 0-8: 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, and 500 nM of peptides. (B) The ratio of protein-bound fraction were plotted against the corresponding protein concentration, and fitted based on the 1:1 binding model. The equilibrium dissociation constants (K_d) of Sp1ZF6(Gly)10, Sp1ZF6(GE)4, and Sp1ZF6(GR)4 to the GCmixGC sequence were 9.2 nM, 14.3 nM, and 5.6 nM, respectively.

第二節 6-亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 結合様式

まず、新たに作製した 6-亜鉛フィンガー蛋白質の離れた二つの、GC ボックス配列への結合様式を調べるために、ゲルシフトアッセイを行った。基質として、GCmixGC 配列を含む 48 bp の DNA フラグメントを使用した。Figure 2-2A から明らかなように、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 とともに濃度依存的に一種類の結合バンドが現れた。この結果から、これらの蛋白質は GCmixGC 配列と一種類の 1:1 の複合体を形成していることが示唆される。また、解離定数を算出するため、各濃度における結合の割合をプロットし、1:1 のモデルに基づいた理論式にあてはめた (Figure 2-2B)。その結果、GCmixGC 配列に対する Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の解離定数は、それぞれ 9.2 nM、14.3 nM、5.6 nM となった。顕著な違いはないものの、Sp1ZF6(GR)4 の親和性が最も高く、Sp1ZF6(GE)4 の親和性が最も低いという傾向は再現性よくみられた。

次に、これらの蛋白質の塩基認識特異性をメチル化干渉法によって調べた。この方法では、緩和な条件でランダムに DNA のグアニン塩基の N7 をメチル化したものを基質として蛋白質との結合反応を行い、反応溶液をゲル電気泳動することによって、結合バンドと遊離 DNA とを分離する。認識に関与するグアニン塩基が修飾されている DNA フラグメントには蛋白質が結合できないと考えられる。蛋白質が結合した DNA、及び遊離 DNA のそれぞれをゲルより回収し、ピペリジンによる切断を行う。これをシーケンスゲルで電気泳動することによって、それぞれのバンドに含まれる修飾を受けたグアニン塩基を検出することができる。遊離 DNA では検出されるが、蛋白質結合 DNA では検出されないグアニン塩基が、蛋白質による DNA 認識に深く関わっていると解釈できる (43)。Figure 2-3 に見られるように、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の全ての場合において、蛋白質結合 DNA におけるバンドの消失パターンはほとんど等しく、これらの蛋白質が二つの GC ボックスに含まれるグアニン塩基とのコンタクトを行っていることが示唆された。ゲルシフトアッセイとメチル化干渉法の結果から、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 は若干の親和性の違いを示すものの、両方の GC ボックスに同じように結合していることが示唆される。

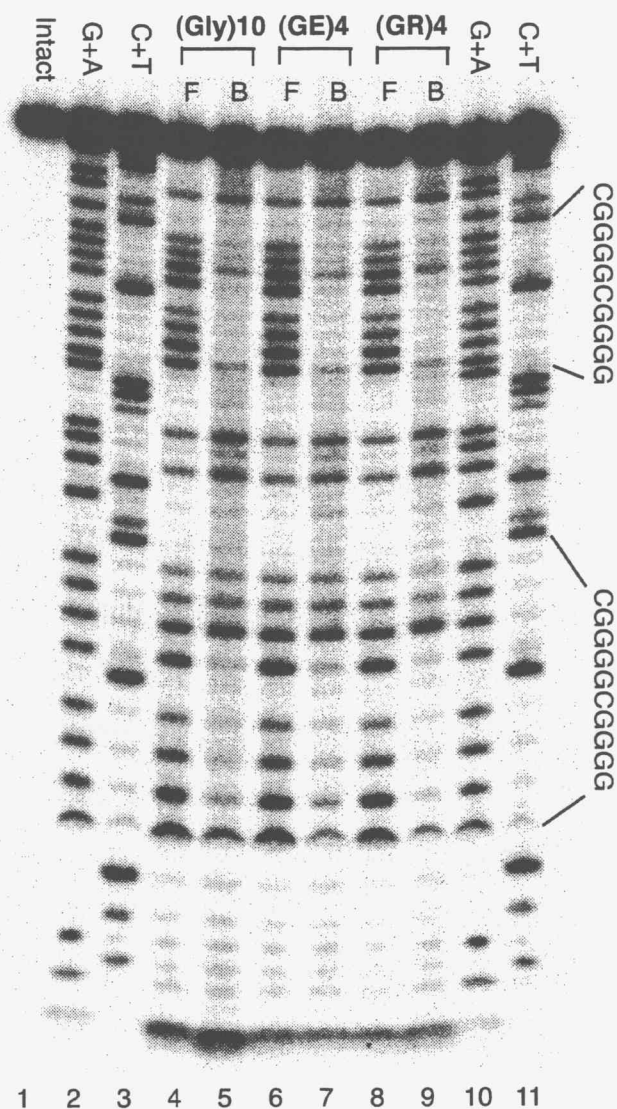


Figure 2-3 Methylation interference analyses for Sp1ZF6(Gly)10, Sp1ZF6(GE)4, and Sp1ZF6(GR)4 bindings to the GCmixGC sequence. Lanes 4-9 present free (F) and protein-bound (B) DNA samples. Lanes 2 and 10 indicate G+A of the Maxam Gilbert sequencing reaction, lanes 3 and 11 C+T, and lane 1 intact DNA.

第三節 Phasing Analysis による DNA 構造変化の検出

DNA の湾曲は DNA のリン酸バックボーンの中和によっても誘発されることが実験的に確かめられている (18-20)。また、様々な蛋白質-DNA 複合体の構造解析の結果から、蛋白質中の塩基性アミノ酸残基と DNA リン酸バックボーンとの相互作用による DNA 構造変化の例も報告されている (21-26)。Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 のリンカー部分は、メチル化干渉法の結果から、DNA の認識には直接関与していないと考えられるが、もし、電荷を有するリンカー部分が DNA のリン酸バックボーンと相互作用していれば、生じる DNA 構造変化が、グリシンのみのリンカーの場合とは異なる可能性がある。そこで、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の結合による DNA の構造変化を Phasing Analysis (37) によって調べた。

基質としては、配列に依存した DNA 構造による影響を考慮して、GCmixGC または、GCatGC 配列を含む一連の pPhase プラスミドを制限酵素 *Pvu*II 部位で切断した 467 bp のフラグメントを用いた。第一章で述べたように、基質 DNA には、108°の湾曲を有する六つの poly AT tracts、離れた二つの GC ボックスを含む蛋白質結合配列、およびこれらの配列間にそれぞれ長さの異なる (8, 10, 12, 14, 16, 18 bp) スペーサー配列が含まれている。スペーサーの長さの違いに依存してポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるバンドの移動度が異なれば、蛋白質結合配列を含む領域中に何らかの DNA 構造変化が存在していることが示唆されることになる。Figure 2-4 はそれぞれ、GCmixGC を基質とした場合の、各 6-亜鉛フィンガー蛋白質の Phasing Analysis の結果である。泳動バッファーとしてトリス-ホウ酸バッファーを使用している。第一章での結果と同様に、蛋白質非存在下でも移動度に違いが生じ、また、いずれの 6-亜鉛フィンガー蛋白質が結合した場合にも、スペーサーの長さの違いによる結合バンドの移動度の違いが生じた。各蛋白質の結合によって生じる DNA 構造変化の度合いを比較するために、スペーサー長を横軸にとって、各スペーサー長に対応する相対移動度をプロットし、コサインカーブでフィッティングを行った。Figure 2-4 の解析結果は Figure 2-5A に示している。振幅の大きさは湾曲の大きさを、また、位相は湾曲の方向を反映している。Figure 2-5A より、GCmixGC 配列に Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 が結合したときに生じる DNA の構造変化は、Sp1ZF6(GE)4

の場合にわずかに振幅の大きさが小さくなるものの、ほとんど同じであることが明らかとなった。また、Figure 2-5B は同じ泳動条件で GCatGC 配列に結合した場合の結果である。リンカーの違いによらず三つの蛋白質とも、ほとんど同じ DNA 構造変化を引き起こしていることがわかる。また、興味深いことに、蛋白質非存在下での DNA フラグメントの移動度が描くコサインカーブは GCmixGC と GCatGC とで明らかに異なっているにも関わらず、蛋白質結合バンドの描くコサインカーブは配列の違いによらず類似している。

これらの結果から、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の結合によって生じる DNA 構造変化は DNA 配列に依存せず、ほとんど同じであると考えられる。おそらく、リンカー部分の電荷は DNA リン酸バックボーンとの相互作用には関わっていないか、平衡状態での相互作用は非特異的であることが示唆される。リンカーの性質よりも、リンカーペプチド鎖の長さが DNA 構造に影響を与えていることが示唆される。

DNA のフレキシビリティはカチオンの存在によって影響を受けることが知られている (47)。また、カチオンの存在によって、電荷を有するリンカー部分の状態が変化する可能性もあり得る。そこで、DNA の構造に与えるマグネシウムイオンの影響を調べるために、基質 DNA と蛋白質との結合反応条件はかえずに、泳動バッファーとして 2 mM 塩化マグネシウムを含むトリス-ホウ酸バッファーを用いて、Phasing Analysis を行った。基質としては、GCmixGC 配列を含む一連のフラグメントを用いた。この解析結果を Figure 2-5C に示す。また、反応溶液に 2 mM 塩化マグネシウムを添加し、さらに 2 mM 塩化マグネシウムを含むトリス-ホウ酸バッファーを泳動バッファーとした Phasing Analysis も行った。この条件下でも、DNA フラグメントの移動度の変化の度合いは Figure 2-5C に示したコサインカーブと酷似した。塩化マグネシウムを含まないトリス-ホウ酸バッファーを泳動バッファーとしたときの結果を示す Figure 2-5A と比較して明らかなように、2 mM 塩化マグネシウムを含むトリス-ホウ酸バッファーを泳動バッファーとしたとき、蛋白質非存在下での DNA フラグメントの移動度の変化は、スペーサーの長さの違いによらず、ほとんど一定になった。一方、蛋白質が結合した DNA に関しては、振幅の大きさが若干小さくなってはいるものの、Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 とともにほとんど同じ構造

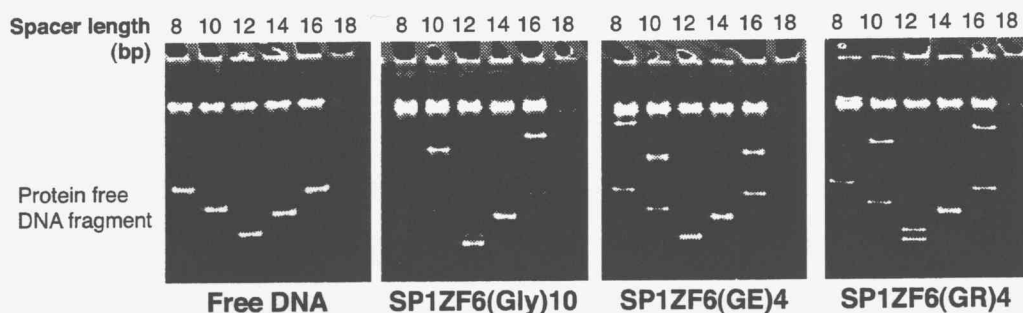


Figure 2-4 The results of phasing analyses for Sp1ZF6(Gly)10, Sp1ZF6(GE)4, and Sp1ZF6(GR)4 bindings to the phasing DNA fragments with GCmixGC sequence. Both protein-free and protein-bound bands were detected under the protein concentrations. The upper bands with equal mobility are the DNA fragments derived from vector plasmids.

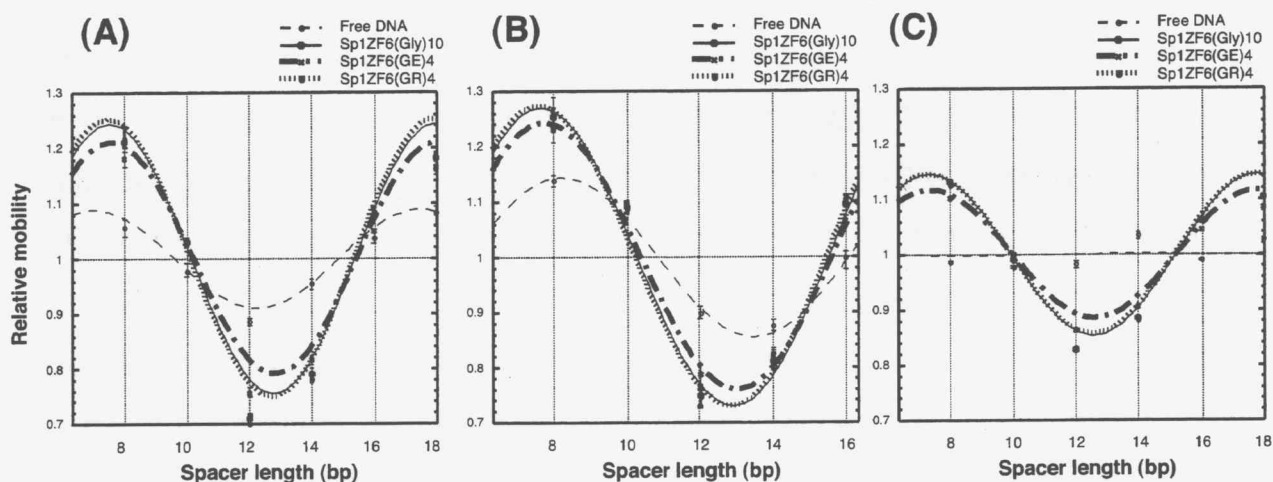


Figure 2-5 Cosine curves of plot of relative mobility versus spacer length. The protein binding sequences were GCmixGC (A, C) and GCatGC (B). The cosine curves are based on the results of the phasing analyses for each protein electrophoresed in the absence (A, B) or presence (C) of 2 mM MgCl₂. The electrophoretic mobility of the phasing DNA fragments is plotted versus the spacer length. Data were normalized to the average mobility over the entire spacer range.

変化を引き起こすことが示唆された。

この結果から、配列に依存する DNA 構造の揺らぎがマグネシウムの存在によって安定化されたことが示唆される。Strauss らは、非対称に中和されたリン酸バックボーンを有する DNA を合成し、これが湾曲構造を有することを示している。さらに、その湾曲構造がマグネシウムイオン、コバルトイオン、またはスベルミンのような多価のカチオンを添加することによって変化、解消することを示している (18)。Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の結合バンドでは、マグネシウムイオンの添加によっても DNA 湾曲の存在が示唆されたことから、これらの 6-亜鉛フィンガー蛋白質の結合による DNA 湾曲に、リン酸バックボーンとの相互作用は重要な役割を果たしていないと考えられる。

第四節 表面プラズモン共鳴を利用した結合速度解析

6-亜鉛フィンガー蛋白質の DNA への結合において、電荷を有するリンカー領域が何らかの影響をおよぼしているのかどうかを調べるために、BIACORE 社の BIACORE X を用いて速度論的な解析を行った。この装置は、センサーチップ表面に固定されたりガンドに、流路系を介してサンプルを添加することによって、センサー表面で起こる分子間の結合、または解離によって生じる質量変化を、表面プラズモン共鳴 (SPR) のシグナル変化としてリアルタイムで検出する (Figure 2-6A) (48)。センサーチップは片面が金薄膜で覆われたガラススライドで、金薄膜側にリガンドが固定される。ガラス面側に、全反射する様々な角度からの偏向を照射すると、金薄膜上にエバネッセント波が生じる。特定の入射角の時に生じるエバネッセント波は、金薄膜の自由電子波の共鳴に利用され、反射光の強度が減少する。これが、SPR 現象である。SPR が生じる角度は金薄膜表面での溶媒の濃度に依存するため、薄膜上に固定化されたりガンドへのサンプル中の分子の結合によって、金薄膜表面での溶媒の濃度が変化し、SPR 角がシフトする (Figure 2-6B)。0.1 度のシフトが 1000 レスポンスユニット (RU) と定義されており、1000 RU はセンサーチップ上での蛋白質約 1 ng/mm^2 の質量変化に相当する。SPR 角の変化量をリアルタイムでレスポンスユニットに変換し、時間に対してプロットしたものが、センサーグラムとして表示され

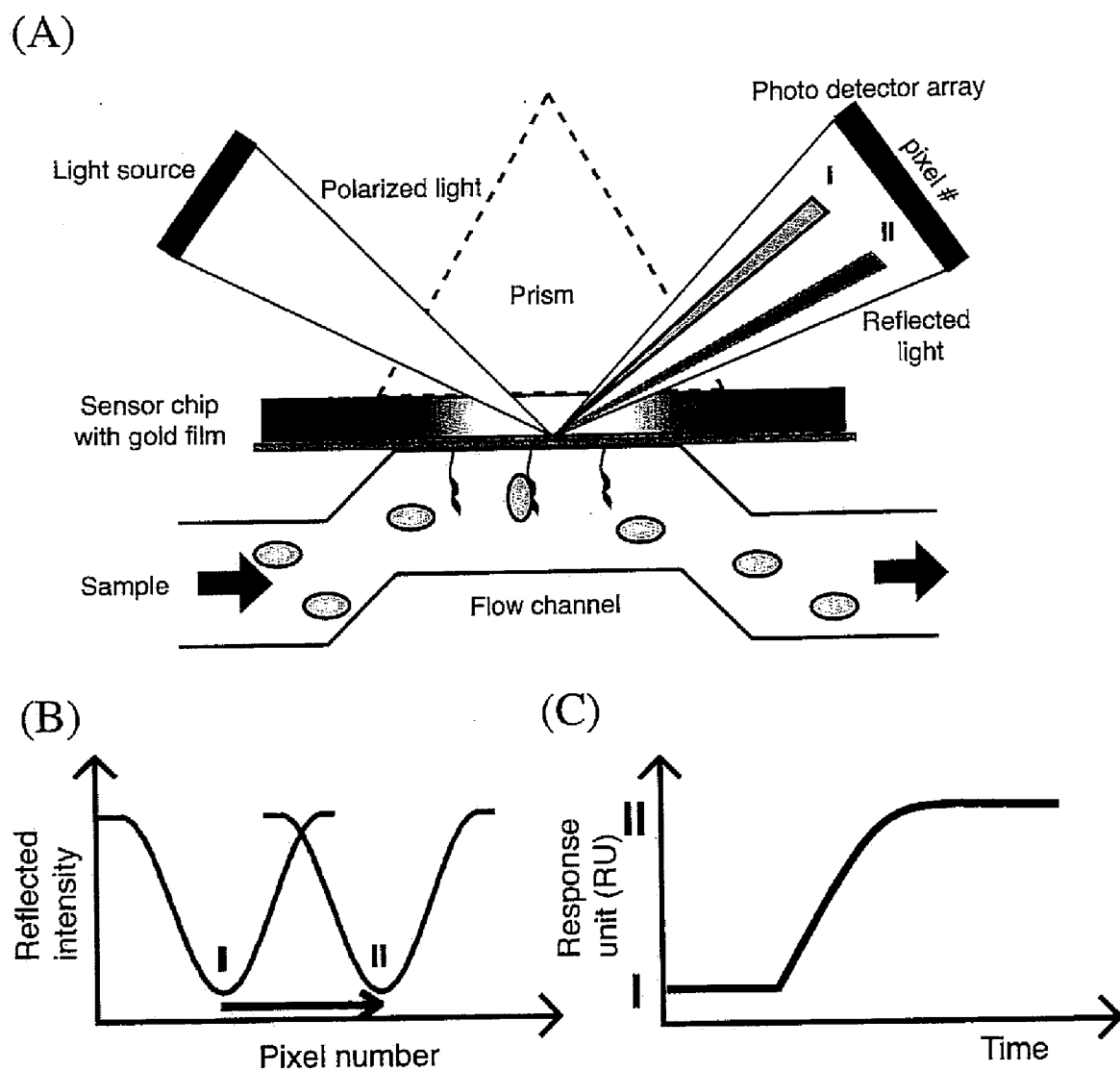


Figure 2-6 The principles of detection of protein-DNA interaction by SPR phenomenon. (A) Biotinylated DNA fragments are immobilized on the surface of the gold film coated with streptavidin. Sample (DNA binding proteins) solution is injected to the flow channel and flown at the constant flow rate. (B) SPR is observed as a dip in reflected intensity at an angle. The SPR angle shifts when proteins bind to the DNA immobilized on the surface and change the refractive index of the surface layer. (C) The SPR signal is monitored continuously and plotted against time.

る (Figure 2-6C)。

本研究では、センサーチップ SA を用いた。このセンサーチップは金薄膜表面に予めリンカーを介してストレプトアビジンが固定化されている。まず、GCmixGC 配列のグアニン塩基に富む鎖の 5'末端をビオチン化した二本鎖 DNA を流路に添加し、センサーチップ SA への固定化を行った。マストランスポートリミテーション効果を抑制するために、DNA の固定化量は、200-300 レスポンスユニット (RU) になるようにした。ここに各蛋白質溶液を加え、固定化された DNA への結合量をレスポンスユニット値の変化量として検出した。測定は 30 度で行った。各蛋白質とも、5 nM から 800 nM の間で濃度を六点以上ふって測定を行った。各測定は、蛋白質溶液を 5 分間流した後、バッファーのみを 10 分間流することによって行われた。Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、または Sp1ZF6(GR)4 と GCmixGC 配列を含む DNA との相互作用を表すセンサーグラムの例を Figure2-6A に示す。各センサーグラムは、DNA を固定化した流路から得られたセンサーグラムの RU 値から、固定化処理を施していないコントロールの流路から得られたセンサーグラムの RU 値を差し引いたものである。わずかに Sp1ZF6(Gly)10 の解離速度が速いことが Figure2-6A より示唆される。

各濃度における結合段階の最終レスポンスユニット値 R_{eq} を濃度に対してプロットすることによって、各蛋白質の最大結合量 (R_{max}) を算出した。さらに、相対結合量 R_{eq} / R_{max} を濃度に対してプロットし、一対一の結合モデルに基づく式 2-3 (実験の部参照) にフィッティングさせることによって、平衡解離定数 (K_d) を算出した (Figure 2-6B)。Sp1ZF6(Gly)10、Sp1ZF6(GE)4、Sp1ZF6(GR)4 の K_d 値はそれぞれ、 7.03×10^{-8} (M)、 8.75×10^{-8} (M)、 1.18×10^{-8} (M) となった (Table 2-1)。Sp1ZF6(Gly)10 と Sp1ZF6(GE)4 の K_d 値はほとんど同じであったが、Sp1ZF6(GR)4 は約 7 倍親和性が高いことが明らかになった。この K_d 値の違いが結合のどの段階に起因するのかを調べるために、センサーグラムを利用して、解離速度定数 (k_{diss}) と結合速度定数 (k_{ass}) を算出した。解離速度定数 (k_{diss}) はセンサーグラムの解離段階から二点をとることによって、式 2-4 (実験の部参照) により直接算出した。また、結合速度定数 (k_{ass}) は式 2-5 (実験の部参照) から算出した (Table 2-1)。興味深いことに、結合段階においても解離段階においても Sp1ZF6(GR)4 は他の二つの蛋白質と比べて顕著な違いを示さなかった。すなわち、Sp1ZF6(GR)4 と Sp1ZF6(Gly)10 の k_{ass} 値および、Sp1ZF6(GR)4 と Sp1ZF6(GE)4

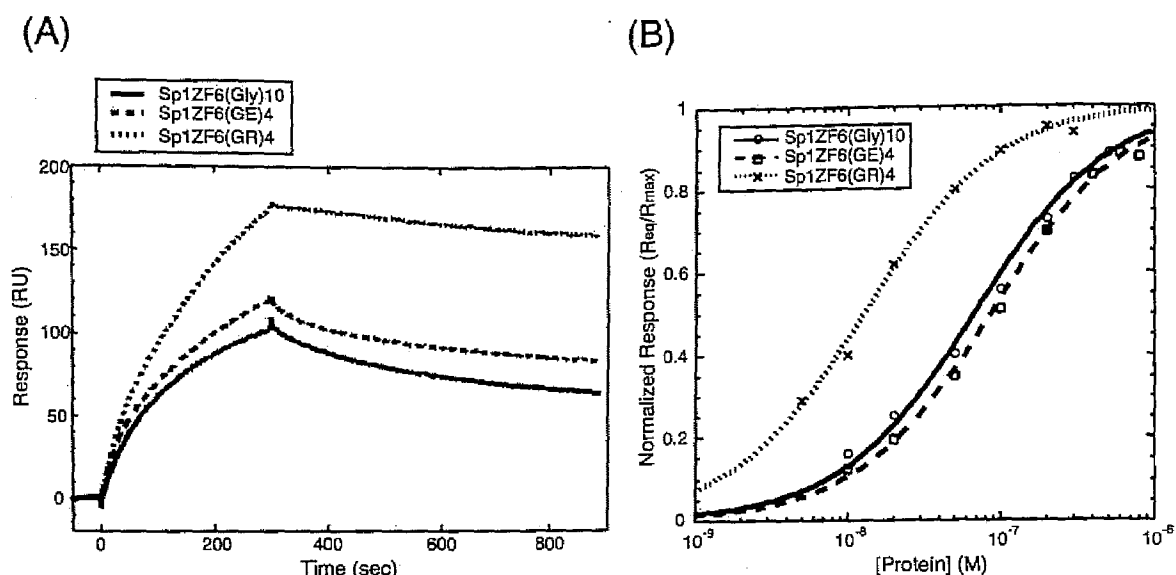


Figure 2-6 (A) Sensorgrams for binding reaction of 50 nM of Sp1ZF6(Gly)10, 50 nM of Sp1ZF6(GE)4, and 20 nM of Sp1ZF6(GR)4 to GCmixGC sequence. (B) Fitting data for a 1:1 binding model. The responses were normalized using the fitted value for the maximum response at equilibrium.

Table 2-1 Association and dissociation rate constants.

DNA	protein	k _{diss} (s ⁻¹)	k _{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (M)
GCmixGC	G10	$(8.24 \pm 0.33) \times 10^{-4}$	$(1.17 \pm 0.05) \times 10^4$	$(7.03 \pm 0.06) \times 10^{-8}$
	(GE)4	$(4.21 \pm 0.99) \times 10^{-4}$	$(4.79 \pm 0.65) \times 10^3$	$(8.75 \pm 1.46) \times 10^{-8}$
	(GR)4	$(2.40 \pm 0.39) \times 10^{-4}$	$(2.02 \pm 0.25) \times 10^4$	$(1.18 \pm 0.13) \times 10^{-8}$
GC	G10	$(9.01 \pm 0.55) \times 10^{-4}$	$(1.05 \pm 0.51) \times 10^4$	$(8.74 \pm 1.00) \times 10^{-8}$
	(GE)4	$(3.64 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(4.38 \pm 0.06) \times 10^3$	$(8.26 \pm 0.27) \times 10^{-8}$
	(GR)4	$(3.21 \pm 0.20) \times 10^{-4}$	$(1.52 \pm 0.14) \times 10^4$	$(2.11 \pm 0.23) \times 10^{-8}$

の k_{diss} 値がほぼ等しいことが明らかになった。リンカーの異なる三つの蛋白質と DNA との相互作用において、結合段階では Sp1ZF6(GE)4 が他の二つよりも小さな k_{ass} 値を示したのに対し、解離段階では Sp1ZF6(Gly)10 が他の二つよりも大きな k_{diss} 値を示した。

SPR による測定の実験スケールは小さいため、BIAcore の測定値が、各蛋白質が二つの GC ボックス配列の両方と同時に相互作用した時の結果を表しているのかわかるとは明らかではない。実際、GC ボックス配列を一つしか含まない DNA を固定化して測定した場合も、ほとんど同じ値が得られた。また、Phasing Analysis の結果から、6-フィンガー蛋白質のリンカー部分は、DNA との相互作用への寄与が小さいことが示唆されている。しかしながら、SPR による速度論的解析の結果から、非特異的な相互作用によって、リンカー部分が DNA との結合、解離に影響を与えていることが示唆された。リンカー部分の電荷のみならず、フレキシビリティの違いなどを含めたリンカーの構造も 6-フィンガー蛋白質と DNA との相互作用に寄与していることが、その要因の一つとして考えられる。

Ukiyama らは、大きな DNA 構造変化を誘発する HMG ボックス蛋白質の一つである SRY 蛋白質と DNA との相互作用と転写活性への影響を、DNA 構造変化、及び結合の速度論的安定性の観点から研究し、興味深い結果を報告している (27)。SRY が誘発する DNA 湾曲は転写開始複合体の形成にとって重要であることが知られている。彼等は、ヒト SRY と、その 1 アミノ酸置換体であるチンパンジー SRY とを比較した。これらは DNA に結合して同様の DNA 構造変化を誘発するが、チンパンジー SRY と DNA 複合体の方が 3-4 倍長い半減期を示し、転写活性化能が高いことが報告された。彼等はその原因として、湾曲 DNA の安定性が転写開始複合体の活性化状態を保持することに寄与している可能性を示唆している。この報告からも、同様の DNA 構造変化を誘発するが、速度論的安定性が異なる DNA 結合蛋白質は、転写制御に向けて興味深い特徴を示すと考えられる。

本研究で新たに創製した 6-亜鉛フィンガー蛋白質、Sp1ZF6(GE)4、及び Sp1ZF6(GR)4 は離れた二つの GC ボックス配列に結合し、DNA 湾曲を誘発した。Sp1ZF6(Gly)10 と比較して、リンカー部分に存在する電荷の違いにかかわらず、これらの蛋白質は、同様の DNA 結合様式を示し、また、ほとんど等しい DNA 構造変化を引き起こした。

一方、DNA 結合の速度論的特徴は互いに異なることが明らかとなった。特に、解離段階においては、Sp1ZF6(Gly)10 が最も速く、Sp1ZF6(GR)4 が最も遅かった。同じ DNA 構造変化を誘発するにもかかわらず、異なる速度論的特徴を有するこれらの新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質は、配列選択的な転写における速度論的制御に向けて、興味深い知見を示したと考えられる。

総 括

序章 新規亜鉛フィンガー蛋白質の創製 遺伝子の転写は蛋白質の配列特異的な DNA 結合のみならず、離れた塩基対間に存在する蛋白質同士の相互作用によって初めて開始される。この蛋白質間の相互作用を可能にする要因の一つは DNA 構造変化である。それ故、任意の塩基配列結合能を有し、さらに DNA 湾曲を誘発する新規蛋白質は、人工転写制御因子としての可能性を秘めていると考えられる。これまでに、代表的な DNA 結合モチーフの一つである亜鉛フィンガーモチーフを複数個連結させることによって、結合塩基配列の拡張が可能であることが示されてきた。また、ファージディスプレイ法によって任意の塩基配列結合能を有する亜鉛フィンガー蛋白質を選択できることが報告されており、亜鉛フィンガーモチーフは新規 DNA 結合蛋白質の創製にとって極めて魅力的である。本研究では、転写因子 Sp1 の DNA 結合領域に存在する三つの亜鉛フィンガー同士を様々なリンカーで連結することにより、六つの亜鉛フィンガーを有する新規蛋白質を創製し、これらの DNA 構造に与える影響および DNA 結合の速度論的特性について検討した。

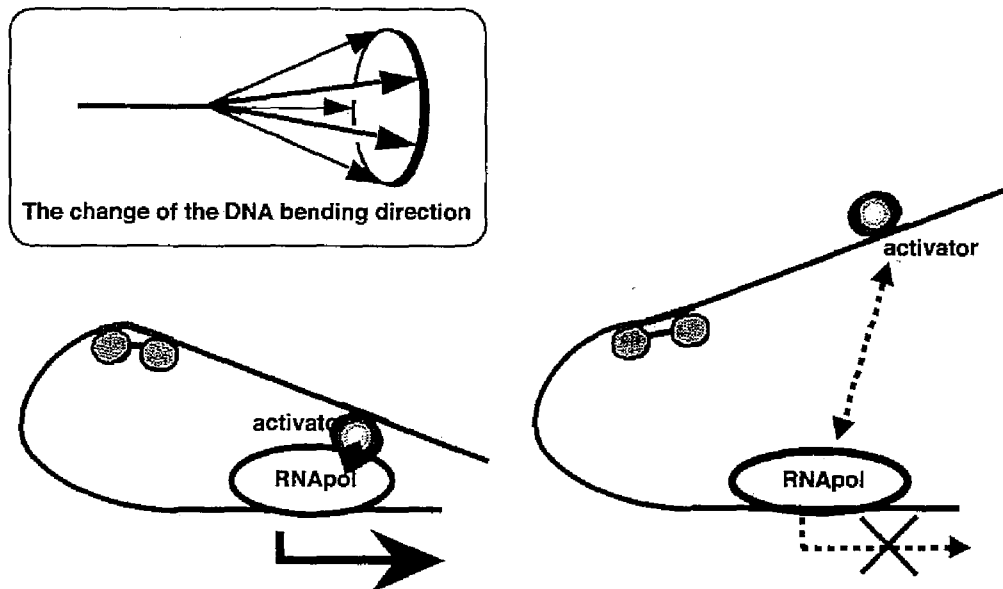
第一章 ポリグリシンリンカーを有する新規 6-亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 湾曲の誘発 転写因子 Sp1 の DNA 結合領域に存在する三つの亜鉛フィンガー (Sp1(530-623)、以下 WT と表す) 同士をグリシン 4 個、7 個、10 個からなるリンカー配列を用いて連結させた新規蛋白質 Sp1ZF6(Gly)4、Sp1ZF6(Gly)7、Sp1ZF6(Gly)10 (以下 G4、G7、G10 と表す) を創製し、リンカーの長さの違いが標的塩基配列の構造に及ぼす影響を様々なゲル電気泳動法によって解析した。WT は GC ボックスとよばれる塩基配列に特異的に結合する。そこで、6-亜鉛フィンガー型蛋白質の結合による構造変化が期待される標的塩基配列として、二つの GC ボックス間に DNA ベリックスの約 1 ターンに相当する 10 塩基対 (bp) を挿入した塩基配列を用いた。また、GC ボックスを一つだけ含む配列をコントロールとして用いた。ヒドロキシルラジカルフットプリント法において、G4、WT が結合した時の DNA 切断パターンに違いは見られなかったが、G7、G10 では WT の場合とは異なり、二つの GC ボックス間の配列中に強い切断が見られた。G7、G10 の結合により二つの結合配列間のマイナーグループが広げられたことが示唆される。また、Phasing Analysis の結果から、G7 と

G10 は離れた二つの GC ボックスに一分子で結合し、二つの GC ボックス間に DNA の軸の方向性を変える構造変化が生じていることが明らかとなった。その変化の大きさは G7 の方が G10 よりも大きく、リンカーの長さは DNA 湾曲の方向性に影響を与えることが示唆された。

第二章 電荷の異なるリンカーを有する DNA 湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製：DNA 結合の速度論解析 蛋白質の結合に伴って生じる湾曲 DNA の安定性は、転写効率に影響を及ぼすことが報告されている。したがって、DNA 湾曲を誘発する蛋白質の DNA 結合の速度論的特性を考慮することは、転写制御にとって有効であると考えられる。そこで、リンカーのアミノ酸残基数は 10 に保ち、電荷を有するアミノ酸であるアルギニン、又はグルタミン酸を新たに導入した新規蛋白質 Sp1ZF6(GR)4、及び Sp1ZF6(GE)4 を創製し、DNA 構造に及ぼす影響と DNA 結合における速度論的特性を Sp1ZF6(Gly)10 と比較した。メチル化干渉法により DNA 認識様式を、Phasing Analysis により DNA 構造変化への影響を、さらに、表面プラズモン共鳴の原理を利用した測定から DNA 結合の速度論的特性に関して検討した。その結果、これらの蛋白質が DNA 認識や DNA 構造変化の点ではほとんど同じ性質を示すにもかかわらず、リンカーの違いによって、湾曲 DNA と蛋白質との複合体の安定性に違いが生じていることが示唆された。

これらの結果は、DNA 湾曲を誘起する新規亜鉛フィンガー蛋白質の分子設計に価値ある知見を示したと考えられる。

転写開始複合体は、たくさんの蛋白質の相互作用によって形成される。DNA 構造のわずかな違いが、転写因子間の協同性に大きな影響を与える (49)。本研究では Sp1ZF6(Gly)7、及び Sp1ZF6(Gly)10 の結合に伴う DNA 構造変化の違いにより、DNA 軸の方向性の違いが生じていることが明らかとなった。この局所的な DNA 構造が、離れた部位での蛋白質-DNA、及び蛋白質同士の相互作用にどのように影響を与えるのかという問題、また、蛋白質の結合によって生じる DNA 湾曲構造の安定性と転写反応との関係など、より複雑な系における、これらの人工蛋白質の活性に興味をもたれる。



Perspective: Even slight differences in DNA bending direction would change the overall intrinsic DNA bending. Each protein-DNA or protein-protein interaction would be enhanced or suppressed. The efficiency of transcription would be affected.

実験の部

第 1 章に関する実験

試薬

本研究で用いた全ての DNA オリゴヌクレオチド及び[γ -32P] ATP は Amersham Pharmacia Biotech 社から購入した。制限酵素及び修飾酵素は、New England Biolab 社または Takara 社より購入した。全ての実験において Milli-Q 水を用いた。

基質プラスミド DNA の構築

pBEND の構築

pUC19 を鋳型とし、プライマー a: 5'-TGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTG-3'、b: 5'-ATCGATCACGAGCAGATCTGAGCTCGGTACCCGG-3'または、プライマー c: 5'-AGATCTGCTCGTGATCGATGCATGCCTGCAGGTCG-3'、d: 5'-GACGGCCAGTGAA TTCGAGCTCGGT-3'を用いて PCR を行い、フラグメント ab 及び cd を得た。次にフラグメント ab 及び cd を鋳型とし、プライマー a と d を用いて PCR を行い、フラグメント ad を得た。フラグメント ad を *Hind*III と *Eco*RI で処理し、*Hind*III/*Eco*RI 処理後に脱リン酸化反応を行ったベクター pUC19 に挿入し、pBEND を作製した。*Bgl*II 反応と脱リン酸化反応を行った pBEND に各蛋白質結合配列を含む二本鎖 DNA を挿入し、実験に用いた。

pPhase の構築

相補的なオリゴヌクレオチド[adp 1-21、adp 1-22]、[A-tractA、A-tractT]、[adp 2-121、adp 2-122]を 5'末端リン酸化後アニーリングを行った。これらを一度にライゲーション後、プライマー I-Aprm、及び adp 2-122 を用いて PCR を行い、フラグメント 2A12 を得た。これを *Hind*III と *Eco*RV で処理し、*Hind*III/*Eco*RV 処理後に脱リン酸化反応を行ったベクター GCmixGC/pBEND に挿入することにより、GCMixGC/pPhase 2A12 を作製した。次に、GCMixGC/pPhase 2A12 を鋳型とし、プライマー adp 1-4p 及び adp 2-10p を用いて PCR を行い、*Hind*III と *Eco*RV で処理し、*Hind*III/*Eco*RV 処理後に脱

リン酸化反応を行ったベクター GCmixGC/pBEND に挿入することにより、GCmixGC/pPhase4A10 を作製した。同様に、GCmixGC/pPhase (n-2)A(m+2)を鑄型とし、プライマー adp1-(n)p、adp2-(m)p を用いて、GCmixGC/pPhase nAm を順に作製した (ただし、n+m=14。n=4, 6, 8, 10, 12)。また、GCmixGC 以外の蛋白質結合配列を有する pPhase の作製は、各配列を有する pPEND から *EcoRI/EcoRV* フラグメントを切り出し、*EcoRI/EcoRV* 処理と脱リン酸化反応を行った各 pPhase nAm に挿入した。

pPhase の構築に使用したオリゴヌクレオチド及びプライマーの配列

A-tractA	5'-CATGGAAAAAACGGGCAAAAAACGGCAAAAAACGGGC AAAAAACGGCAAAAAACGGGCAAAAAAC -3'
A-tractT	5'-CGGTTTTTTTGCCCGTTTTTTGCCGTTTTTTGCCCC TTTTTTGCCGTTTTTTGCCCGTTTTTTC -3'
adp 1-21	5'- TCAATAGCCGAAGCTTAGC -3'
adp 1-22	5'- CATGGCTAAGCTTCGGCTATTG -3'
adp 2-121	5'- CGGATGCGTACAGCTGATATCGTG -3'
adp 2-122	5'- TCTCACGATATCAGCTGTACGCATC -3'
I-Aprm	5'- TAGCCGAAGCTTAGCCATGGAAA -3'
adp 1-4p	5'- AGTTAGAAGCTTGGAGCCATGGAAAAAACG -3'
adp 1-6p	5'- TCGATAAGCTTACGGAGCCATGGAAAAAACGGG -3'
adp 1-8p	5'- TTCAGAAGCTTGTACGGAGCCATGGAAAAA -3'
adp 1-10p	5'- TACGTAAGCTTCTGTACGGAGCCATGGAA -3'
adp 1-12p	5'- GTTAGAAGCTTAGCTGTACGGAGCCATGGAA -3'
adp 2-10p	5'- TCAGTAGATATCCTGTACGCATCCGG -3'
adp 2-8p	5'- CTAGTGATATCGTACGCATCCGGTTT -3'
adp 2-6p	5'- TCTAAGATATCACGCATCCGGTTTTTTGC -3'
adp 2-4p	5'- TTGGAGATATCGCATCCGGTTTTTTGC -3'
adp 2-2p	5'- TTGGAGATATCATCCGGTTTTTTGC -3'

蛋白質発現ベクターの構築及び、蛋白質の精製

DSp1/pUC19 プラスミド (6) を *MfeI* で切断後 Mung Bean Nuclease により平滑化した。さらに *AflIII* で切断し、その後、脱リン酸化反応を行った。ここに、各リンカーアミノ酸配列をコードし、*AflIII* 平滑末端を有する DNA フラグメントを挿入した。ジデオキシ法またはキャピラリーシーケンサー (ABIprism310) によるシークエンスの確認後 *BamHI/EcoRI* で切断し、*BamHI/EcoRI*、脱リン酸化処理済 pEV3b プラスミドに挿入した。発現用プラスミドは、大腸菌 BL21(DE3)pLysS にトランスフォームした。単一コロニーを LB 培地中で 37 度で培養し、 $A_{600}=0.6$ で、IPTG (最終濃度 0.1 mM)、塩化亜鉛 (最終濃度 1 mM) を添加、20 度で一晩インキュベートした。PBS バッファーに溶かした可溶性画分をエコノシステム (BioRad) で MonoS カラム (BioRad) により粗精製し、さらに、BioLogic (BioRad) で S-6 カラムにより濃縮、スマートシステム (Amrsham Pharmacia Biotech) を用いて Superdex75 カラム (Amrsham Pharmacia Biotech) により TN バッファー (10 mM トリス塩酸、50 mM 塩化ナトリウム) でゲル濾過精製を行った。

ゲルシフトアッセイによる蛋白質結合様式の比較

基質 DNA は MIXmixGC/pBEND 及び、GCmixGC/pBEND を *XbaI* で切断したものをを用いた。反応液の組成は、10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、50 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM β -メルカプトエタノール、0.1 mM 塩化亜鉛、0.05% NP-40、5%グリセロール、150 nM 基質 DNA、150-450 nM 亜鉛フィンガー蛋白質で行った。15 時間から 39 時間 4 度でインキュベートした後、8%非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド、ビスアクリルアミド比 74:1) で、トリス-ホウ酸バッファー (88 mM トリス塩酸、88 mM ホウ酸) をランニングバッファーとして、4 度で泳動した。ゲルはエチジウムブロミドで染色後、UV 照射により観察した。

ヒドロキシルラジカル保護法による DNA 構造変化の検出

既報に基づき実験を行った (50)。基質として、5'末端ラベルした G 鎖オリゴヌクレオチドと、その相補鎖をアニーリングした DNA を使用した。反応液は 10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、50 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM β -メルカプトエタノール、

0.1 mM 塩化亜鉛、0.05% NP-40、基質 DNA(20000 cpm)、0、25 または 100 nM の蛋白質を含む。4 度で 15 時間インキュベートした後、[EDTA・Fe(II)] (終濃度 100 μ M)、アスコルビン酸ナトリウム (終濃度 1.1 mM)、過酸化水素 (終濃度 0.003%) を加え、氷上で 4 分間インキュベートした。チオ尿素 (終濃度 0.05 M)、EDTA (終濃度 2 mM) の添加により反応を止め、エタノール沈殿により DNA を回収した。基質 DNA の切断は 15%変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド、ビスアクリルアミド比 29:1、8 M 尿素) 電気泳動により分離した。 -70 度で約二日間 X 線フィルム(Fuji Medical X-ray Films RX)に感光させることにより、バンドを検出した。

Phasing Analysis による DNA 構造変化の比較

基質 DNA として、各 pPhase プラスミドを *Pvu*II で切断したものを用いた。ただし、pPhase 2A12 プラスミドのみ、*Pvu*II プライマーを用いた PCR 産物を基質とした。反応液の組成はゲルシフトアッセイに用いたものと同じである。ただし、基質 DNA 濃度は 34 nM、蛋白質の濃度は GC ボックスを一つ含む基質に対しては、Sp1(530-623) は 40 nM、各 6-フィンガー蛋白質は 90 nM で行った。また、GC ボックスを二つ含む基質に対しては、Sp1(530-623)は 25 または 100 nM、Sp1ZF6(Gly)4 は 70 nM、Sp1ZF6(Gly)7 は 50 nM、Sp1ZF6(Gly)10 は 35 nM で行った。4 度で 2 時間以上インキュベート後、8%ポリアクリルアミドゲル (74:1) で 4 度で 4 時間電気泳動を行った。ランニングバッファーにはトリス-ホウ酸バッファーを使用した。泳動後のゲルはエチジウムブロミド溶液に浸し、UV 照射によってバンドを可視化した。

解析は以下のように行った。スペーサーの長さの異なる各フラグメントの移動度を見かけの塩基対数に換算し、六種類のスペーサーを用いたときの平均移動度を基準として相対移動度 (R_L) を算出した。スペーサーの変化に伴う相対移動度の変化はコサイン関数で表されることが知られている。

$$R_L = 1 + (Aph/2) \cos \{ 2\pi(S-8)/10.5 + b \} \quad (\text{式 1-1})$$

(Aph は振幅を、S はスペーサーの長さ (8-18 bp) を示す。また、b は湾曲の方向を反映する値である。)

各スペーサーの長さにおける相対移動度 (R_L) をプロットし、Kaleida Graph program (Abelbeck software)を用いて式 1-1 にフィッティングさせた。

また、ポリ A による湾曲と GC ボックス部分での湾曲が強めあう時のスペーサーの長さ (Si) は、式 1-2 で表される。

$$Si=(b/2\pi)\times 10.5+8 \quad (\text{式 1-2})$$

この二つの湾曲の中心間の長さのヘリカルターン数は、式 1-3 で表される。

$$H=33.5/10.34+(Si+n)/10.5 \quad (\text{式 1-3})$$

(n は GC ボックス配列の 5'末端から GC ボックス配列中の湾曲の中心までの長さ。)

第 2 章に関する実験

蛋白質発現ベクターの構築及び、蛋白質の精製

第 1 章と同様にして蛋白質発現ベクターの構築及び、蛋白質の精製を行った。

ゲルシフトアッセイによる結合親和性の比較

基質 DNA として、GCmixGC 配列を含む二本の相補的なオリゴヌクレオチドのうち G に富む DNA 鎖の 5'末端を [γ -32P] ATP で標識した後、その相補鎖とアニーリングしたのを用いた。反応液の組成は、10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、50 mM 塩化ナトリウム、1 mM β -メルカプトエタノール、5 mM 塩化マグネシウム、25 ng/ μ l poly(dI-dC)、0.05% Nonidet P-40、5% グリセロール、50 pM 以下の 5'末端標識 DNA フラグメント、及び 0-300 nM の 6-亜鉛フィンガー蛋白質から成る。4 度で 1 時間結合反応を行った後、サンプルを 8%非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド、ビスアクリルアミド比 29:1) で 4 度で泳動した。泳動バッファーにはトリス-ホウ酸バッファー (88 mM トリス塩酸、88 mM ホウ酸) を用いた。

泳動後のゲルは STORM (Amersham Pharmacia Biotech)によって可視化され、ImageQuant ソフトウェア(Molecular Dynamics)によって解析を行った。各蛋白質の GCmixGC に対する解離定数 (Kd) は、基質 DNA のうちの蛋白質結合型 DNA の割合を θ_b とし、それぞれの蛋白質濃度における θ_b をプロットし、Kaleida Graph program (Abelbeck software)を用いて、1:1 の結合モデルに基づいた式 2-2 にフィッティングさせた。



$$\theta_b = [PD] / ([PD] + [D]) \quad (\text{式 2-1})$$

$$\theta_b = [P]_0 / ([P]_0 + K_d) \quad (\text{式 2-2})$$

メチル化干渉法による DNA 認識の確認

既報に基づき実験を行った。基質となる標識 DNA としては、ゲルシフトアッセイに用いたのと同じ DNA のグアニン塩基の N7 位を緩和な条件でメチル化したものを用いた。6-亜鉛フィンガー蛋白質と基質 DNA との結合反応はゲルシフトアッセイと同様に行った。ただし、6-亜鉛フィンガー蛋白質の濃度は蛋白質結合バンドの割合が約 10%になる濃度で行った。4 度で 1 時間反応後、8%非変性ポリアクリルアミドゲル（アクリルアミド、ビスアクリルアミド比 29：1）で電気泳動を行い、約 20 分間 X 線フィルム(Fuji Medical X-ray Films RX)に感光させることにより、バンドを検出した。遊離 DNA および蛋白質結合 DNA の各バンドをゲルより切り出し、溶出バッファー（0.5 M 酢酸アンモニウム、10 mM 酢酸マグネシウム、1 mM EDTA、0.1% SDS）から回収した。この DNA を 10%ピペリジンと 90 度で 30 分間反応させることにより切断後、エタノール沈殿によって回収し、10%変性ポリアクリルアミドゲル（アクリルアミド、ビスアクリルアミド比 19：1）電気泳動により分離した。泳動後のゲルは STORM (Amersham Pharmacia Biotech)によって可視化された。

Phasing Analysis による DNA 構造変化の比較

基質 DNA として、GCmixGC または GCatGC 配列を含む pPhase プラスミドを PvuII で切断したものを用いた。ただし、pPhase 2A12 プラスミドのみ、PvuII プライマーを用いた PCR 産物を基質とした。反応液の組成は、10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)、50 mM 塩化ナトリウム、0.5 mM β -メルカプトエタノール、0.1 mM 塩化亜鉛、0.05% NP-40、5%グリセロール、34 nM 基質 DNA、50 nM6-亜鉛フィンガー蛋白質で結合反応を行った。4 度で 1 時間以上インキュベート後、8%ポリアクリルアミドゲル（74：1）で 4 度で 4 時間電気泳動を行った。ランニングバッファーには TB バッファー（88 mM トリス塩酸、88 mM ホウ酸）または、2 mM 塩化マグネシウムを含む TB バッファーを使用した。泳動後のゲルはエチジウムブロミド溶液に浸し、UV 照射によ

てバンドを可視化した。各バンドの移動度を見かけの塩基対数に変換し、相対移動度を Kaleida Graph program (Abelbeck software)を用いて式 1-1 にフィッティングさせた。

表面プラズモン共鳴を利用した速度論的解析

6-亜鉛フィンガー蛋白質と DNA との相互作用を BIACORE X (BIACORE AB)を使用して調べた。サンプルの調整から測定まで、すべてトリス塩酸バッファー (10 mM トリス塩酸(pH 7.7)、250 mM 塩化ナトリウム、20 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM 塩化亜鉛、0.005% Tween 20) を使用した。ビオチン化したオリゴヌクレオチド (5'-ビオチン-GATATC GGGGCGGGGC TACGAGTCCA GGGGCGGGGC ATGA -3') と非修飾の相補鎖とをアニールし基質 DNA とした。基質の固定化は次のように行った。二つのフローセル (Fc1、Fc2) のうち、Fc2 にのみ基質を固定化し、Fc1 はコントロールとして使用した。まず、ストレプトアビジンでコートされたセンサーチップ(SA5, BIACORE AB)の両方のフローセルをアルカリ溶液 (50 mM 水酸化ナトリウム、1 M 塩化ナトリウム) で洗浄 (20 μ l / min \times 1 min、4 回) した。その後、Fc2 にのみ 50 nM 基質 DNA を注入し、3 M 塩化ナトリウムでの洗浄 (25 μ l / min \times 3 min) により、非特異的に吸着している DNA を除去した。最終的に固定化された DNA 量が約 200-300 レスポンスユニットになるようにした。6-亜鉛フィンガー蛋白質と基質 DNA との相互作用の測定は、流速 20 μ l / min、温度は 30 度で行った。蛋白質の濃度は 5 nM から 800 nM の範囲で変えて測定した。各蛋白質溶液を 5 分間注入した後、バッファーのみを 10 分間注入した。その後、再生溶液 (50 mM 水酸化ナトリウム、50 mM EDTA) を結合した蛋白質が完全に解離するまで 5 μ l ずつ注入した。

データの解析は BIAevaluation version 3.0 を用いて行った。各濃度のサンプルにおいて、サンプル注入を終える直前のレスポンスユニットを R_{eq} (RU)とし、サンプルの濃度 (M) に対する R_{eq} (RU)をプロットし、1:1 の結合モデルに従って、最大結合量 R_{max} (RU)を算出した。それぞれの濃度におけるレスポンスユニットを最大結合量 R_{max} (RU)を 100%として換算した。解離定数 K_d は換算したレスポンスユニットの割合を蛋白質濃度 (C) に対してプロットし、式 2-3 にフィッティングすることによって求めた。

$$R_{eq} = (R_{max} \cdot C) / (C + K_d) \quad \text{式 2-3}$$

解離速度定数 (k_{diss}) は式 2-4 に基づきセンサグラムから BIAevaluation version 3.0 により算出した。

$$R = R_0 \exp(-k_{diss}(t-t_0)) \quad \text{式 2-4}$$

R 、 R_0 はそれぞれ時間 t および t_0 におけるレスポンスユニットの値を表す。また、結合速度定数 (k_{ass}) は式 2-5 により算出した。

$$k_{ass} = k_{diss} / K_d \quad \text{式 2-5}$$

引用文献

1. Miller, J., MacLachlan, A. D., and Klug, A. (1985) *EMBO J.* 4, 1609-1614.
2. Berg, J. M., and Shi, Y. (1996) *Science* 271, 1081-1085
3. Narayan, V. A., Kriwacki, R. W., and Caradonna, J. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 7801-7809.
4. Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991) *Science* 252, 809-817.
5. Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1993) *Science* 261, 1701-1707.
6. Kamiuchi, T., Abe, E., Imanishi, M., Kaji, T., Nagaoka, M., and Sugiyura, Y. (1998) *Biochemistry* 37, 13827-13834.
7. Kim, J-S., and Pabo, C.O. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2812-2817.
8. Liu, Q., Segal, D.J., Ghiara, J.B., and Barbas III, C.F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5525-5530.
9. Beerli, R.R., Segal, D.J., Dreier, B., and Barbas III, C.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14628-14633.
10. Pomerantz, J. L., Wolfe, S. A., and Pabo, C.O. (1998) *Biochemistry* 37, 965-970.
11. Reber, E.J., and Pabo, C.O. (1994) *Science* 263, 671-673.
12. Jamieson, A.C., Wang, H., and Kim, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12834-12839.
13. Choo, Y., Castellanos, A., García-Hernández, B., Sánchez-García, I., and Klug, A. (1997) *J. Mol. Biol.* 273, 525-532.
14. Greisman, H.A., and Pabo, C.O. (1997) *Science* 275, 657-661.
15. Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S., and Buc, H. (1989) *EMBO J.* 8, 4289-4296
16. Gartenberg, M. R., and Crothers, D. M. (1991) *J. Mol. Biol.* 219, 217-230
17. Werner, M.H., Gronenborn, A.M., and Clore, G.M. (1996) *Science* 271, 778-784.
18. Strauss, J. K., and Maher, L. J., III (1994) *Science* 266, 1829-1834.
19. Strauss, J. K., Vaghefi, M. M., Hogrefe, R. I., and Maher, L. J., III (1997) *Biochemistry* 36, 8692-8698.

20. Strauss, J. K., Roberts, C., Nelson, M. G., Switzer, C., and Maher, L. J., III (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9515-9520.
21. Leonard, D. A., Rajaram, N., and Kerppola, T. K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4913-4918.
22. Strauss, J. K., and Maher, L. J., III (1997) *Biochemistry* 36, 10026-10032.
23. Paoletta, D. N., Liu, Y., Fabian, M. A., and Schepartz, A. (1997) *Biochemistry* 36, 10033-10038.
24. Strauss, J. K., and Maher, L. J., III (1998) *Biochemistry* 37, 1060-1066.
25. Schultz, S.C., Shields, G.C., and Steitz, T.A. (1991) *Science* 253, 1001-1007.
26. Li, T., Mead, J., Wolberger, C., and Vershon, A.K. (1995) *Science* 270, 262-269.
27. Ukiyama, E., Jancso-Radek, A., Li, B., Milos, L., Zhang, W., Phillips, N. B., Morikawa, N., King, C-Y., Chan, G., Haqq, C. M., Radek, J. T., Poulat, F., Donahoe, P. K., and Weiss, M. A. (2001) *Mol. Endocrinol.* 15, 363-377.
28. Akiyama, T., and Hogan, M.E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12122-12127.
29. Liberles, D.A., and Dervan, P.B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9510-9514.
30. Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987) *Cell* 51, 1079-1090.
31. Zimm, B.H. and Levene, S.D. (1992) *Q. Rev. Biophys.* 25, 171-204.
32. Wu, J.C. Kozarich, J.W. and Stubbe, J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4694-4697.
33. Yang, J. and Carey, J. (1995) *Methods Enzymol.* 259, 452-468.
34. Wang, L. and Winans, S.C. (1995) *J. Mol. Biol.* 253, 32-38.
35. Mernagh, D.R. and Kneale, G.G. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 4853-4858.
36. Dedon, P.C., Jiang, Z-W., and Goldberg, I.H. (1992) *Biochemistry* 31, 1917-1927.
37. Zinkel, S.S., and Crothers, D.M. (1987) *Nature (London)* 328, 178-181.
38. Crothers, D.M., Haran, T.E., and Nadeau, J.G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7093-7096.
39. Kerppola, T.K., and Curran, T. (1991) *Cell* 66, 317-326.
40. Nagaoka, M., and Sugiura, Y. (1996) *Biochemistry* 35, 8761-8768.

41. Sjøttem, E., Andersen, C., and Johansen, T. (1997) *J. Mol. Biol.* 267, 490-504.
42. Shi, Y. and Berg, J.M. (1996) *Biochemistry* 35, 3845-3848.
43. Kuwahara, J., Yonezawa, A., Futamura, M., and Sugiura, Y. (1993) *Biochemistry* 32, 5994-6001.
44. Yokono, M., Saegusa, N., Matsushita, K., and Sugiura, Y. (1998) *Biochemistry* 37, 6824-6832.
45. Paolella, D. N., Palmer, C. R., and Schepartz, A. (1994) *Science* 264, 1130-1133.
46. Imanishi, M., Hori, Y., Nagaoka, M., and Sugiura, Y. (2000) *Biochemistry* 39, 4383-4390.
47. Harrington, R. E. (1978) *Biopolymers* 17, 919-936.
48. Jönsson, U. D., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Lundh, K., Löfas, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, J., Sjölander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H., and Malmqvist, M. (1991) *BioTechniques* 11, 620-627.
49. Carey, M. (1998) *Cell* 92, 5-8.
50. Tillius, T. D., and Dombroski, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5469-5473.

謝 辞

終わりに臨み、終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 杉浦幸雄教授に深く感謝の意を表します。

御懇切な御助言並びに御激励を頂きました 二木史朗博士（京都大学化学研究所助教授）、永岡 真博士（京都大学化学研究所）、森井 孝博士（現 京都大学エネルギー理工学研究所）、奥野恭史博士（京都大学化学研究所）、神内達也修士に心より感謝申し上げます。活発な御討議を頂きました 荒木道啓博士（現 ボストン大学）、松下恵三修士、堀 雄一郎修士に深く感謝の意を表します。また、本研究の一部は、日本学術振興会の援助によるものであり、感謝いたします。

研究、及び大学院生活を有意義なものとして下さいました、京都大学化学研究所生体反応設計部門Ⅱの皆様に、心より感謝いたします。

研究の道に進むことを理解し、暖かく支援して下さい、家族、友人に心より感謝いたします。